

# 痙攣発症におけるメタロチオネインの役割とその応用

著者	永沼 章
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/41322">http://hdl.handle.net/10097/41322</a>

# 痙攣発症におけるメタロチオネインの役割とその応用

(課題番号 10557217)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 永 沼 章

(東北大学大学院薬学研究科教授)

## は し が き

メタロチオネインは構成アミノ酸の約 1/3 をシステインが占め、しかも S-S 結合を一つも持たないことから、本蛋白質の生理作用として知られる重金属毒性軽減作用やフリーラジカル除去作用はこれらシステイン残基に由来するものと考えられている。しかし、メタロチオネインは人間からカビに至るまでほとんど全ての生物種に広く存在する蛋白質であり、本来の存在意義は他にあるとの可能性も否定できない。

本研究申請者は細胞内メタロチオネインの一部が核内に移行するとの報告があることから、メタロチオネインが遺伝子の発現調節に関与している可能性を考え、メタロチオネイン遺伝子欠損マウスおよび正常マウスの肝臓から不死化細胞株を樹立してディファレンシャルディスプレイ法で両細胞間で発現量の異なる遺伝子の検索を試みた。その結果、メタロチオネイン遺伝子欠損細胞では発現が認められず、正常細胞でのみ高発現している遺伝子 (NM31) が存在することを明らかにした。NM31 はペンチレンテトラゾールによって誘発される痙攣 (けいれん) 発症に関与する遺伝子として同定・報告されている PTZ-17 と同一であり、ヒトやラットおよびマウスの脳で特異的に高い発現が認められる。痙攣発症時にはカルシウムの神経細胞内への流入が起こるが、PTZ-17 はペンチレンテトラゾールによりその発現が顕著に誘導され、また、PTZ-17 の発現がカルシウムの流入を促進することから PTZ-17 は痙攣発症の鍵となる遺伝子の一つと考えられる。したがって、PTZ-17 遺伝子の発現に必須な蛋白質であるメタロチオネインは痙攣の発症を調節する重要な細胞内因子である可能性が高い。

メタロチオネインには 4 種類 (メタロチオネイン 1~4) の分子種が知られており、脳中に主に存在する分子種はメタロチオネイン-3 である。したがって、脳中での PTZ-17 の発現にはこのメタロチオネイン-3 が関与している可能性が考

えられる。脳や睾丸以外の組織中での主要分子種はメタロチオネイン-1 および-2 であるが、本研究申請者らがP T Z-1 7 遺伝子の検索に用いたメタロチオネイン 遺伝子欠損マウスはメタロチオネイン-1 および-2 を共に欠損したものであり、肝臓などの組織ではP T Z-1 7 遺伝子の発現が認められないが、脳中ではメタロチオネイン-3 遺伝子およびP T Z-1 7 遺伝子が共に正常に発現している。そこで本研究では、メタロチオネイン-3 およびその他の各分子種がNM3 1 の発現に果たす役割を検討する共に、メタロチオネインの発現量の違いがペンチレンテトラゾールの細胞毒性に及ぼす影響などについても検討を加えた。



## 研 究 組 織

研究代表者：永沼 章（東北大学大学院薬学研究科・教授）  
研究分担者：宮入伸一（東北大学大学院薬学研究科・助教授）  
研究分担者：三浦伸彦（東北大学大学院薬学研究科・助手）  
研究分担者：西山省二（明治製菓（株）薬品総合研究所主席研究員）

## 研 究 経 費

平成10年度	6, 800千円
平成11年度	6, 100千円
計	12, 900千円

## 研 究 発 表

### （1）学会誌等

1. Miura, N., Satoh, M., Imura, N. and Naganuma, A., Protective effect of bismuth nitrate against injury to the bone marrow by g-irradiation in mice: possible involvement of induction of metallothionein synthesis. J. Pharmacol. Exp. Ther., 286, 1427-1430 (1998).
2. Miyairi, S., Shibata, S. and Naganuma, A., Determination of metallothionein by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using an isocratic solvent system. Anal. Biochem., 258, 168-175 (1998).
3. Hanada, K., Sawamura, D., Tamai, K., Baba, T., Hashimoto, I., Muramatsu, T., Miura, N. and Naganuma, A., Novel function of metallothionein in photoprotection: metallothionein-null mouse exhibits reduced tolerance against ultraviolet-B injury in the skin. J. Invest. Dermatol., 111, 582-585 (1998).
4. Okazaki, Y., Miura, N., Satoh, M., Imura, N. and Naganuma, A., Metallothionein-mediated resistance to multiple drugs can be induced by several

- anticancer drugs in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 815-818 (1998).
5. Nakagawa, I., Suzuki, M., Imura, N. and Naganuma, A., Involvement of oxidative stress in paraquat-induced metallothionein synthesis under glutathione depletion. *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 1390-1395 (1998).
  6. Hanada, K., Sawamura, D., Hashimoto, I., Kida, K. and Naganuma, A., Epidermal proliferation of the skin in metallothionein-null mice. *J. Invest. Dermatol.*, 110, 259-262 (1998).
  7. Asahi, I., Miura, N., Yamabe, Y., Toyoda, H., Imura, N., Koyama, M. and Naganuma, A., PF1070A, a novel and potent inducer of the synthesis of metallothionein. *Biochemistry*, 38, 10415-10423 (1999).
  8. Yasuno, T., Matsumura, T., Shikata, T., Inazawa, J., Sakabe, T., Tsuchida, S., Takahata, T., Miyairi, S., Naganuma, A. and Sawada, T., Establishment and characterization of cisplatin-resistant human neuroblastoma cell line. *Anticancer Res.*, 19, 4049-4057 (1999).
  9. Toyoda, H., Mizushima, T., Satoh, M., Iizuka, N., Nomoto, A., Chiba, H., Mita, M., Naganuma, A., Himeno, S. and Imura, N., HeLa cell transformants overproducing mouse metallothionein show in vivo resistance to cis-platinum in nude mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 91-98 (2000).

## (2) 総説等

1. 永沼 章 金属結合蛋白質メタロチオネインの役割ー遺伝子ノックアウトマウスの知見から バイオメタルー生体調節の多彩な役割と病態ー, 山口正義 編, 黒船出版, 静岡 153-170 1998.
2. Hanada, K., Sawamura, D., Tamai, K., Baba, T., Hashimoto, I., Muramatsu, T., Miura, N. and Naganuma, A. Metallothionein-null mouse exhibits reduced tolerance against ultraviolet-B injury in the skin *Molecular Medicine: Novel Findings of Gene*

Diagnosis, Regulation of Gene Expression, and Gene Therapy, Eds. by Hashimoto, I. et al., Elsevier Science Publ. B V, Amsterdam 137-144 1999.

3. Miyairi, S. and Naganuma, A. Metallothionein determination by isocratic HPLC with fluorescence derivatization Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols, Ed. by Armstrong, D., Human Press Inc., Totowa, U. S. A. in press 2000.

### (3) 口頭発表

1. 三浦伸彦, 永沼 章: メタロチオネインノックアウトマウスから樹立した不死化細胞を用いたメタロチオネインの生理機能の検討. 日本生化学会東北支部会第65回例会, 1998.
2. 永沼 章: メタロチオネインはどこまでわかったか. 第71回日本生化学会大会シンポジウム, 1998.
3. 三浦伸彦, 浦野 勉, 長井和佳子, 永沼 章: メタロチオネインによるNM31遺伝子の発現制御. 第71回日本生化学会大会シンポジウム, 1998.
4. 永沼 章: 薬毒物の毒性から生体を防御する蛋白質メタロチオネイン. 第18回日本中毒学会西日本部会, 1998.
5. 長井和佳子, 三浦伸彦, 永沼 章: メタロチオネイン遺伝子の欠損がシスプラチンの細胞毒性に与える影響. 第71回日本生化学会大会シンポジウム, 1998.
6. 三浦伸彦, 西山省二, 永沼 章: ベツリンによるメタロチオネイン非依存的なカドミウム毒性の軽減作用. メタロチオネイン99, 1999.
7. 長井和佳子, 三浦伸彦, 永沼 章: 低グルタチオン条件下におけるカドミウムおよびシスプラチンの細胞毒性に対するメタロチオネインの防御効果. 日本薬学会第119年会, 1999.
8. 北 加代子, 三浦伸彦, 山崎健太郎, 吉田 稔, 永沼 章: ヒトのメタロチオネイン遺伝子異常の検索. メタロチオネイン99, 1999.

9. 永沼 章: 金属ストレスとその応答: メタロチオネインの合成誘導とその意義. 第25回環境トキシコロジーシンポジウム, 1999.
10. 三浦伸彦, 永沼 章: カドミウムによる熱ショック蛋白質の誘導に対するメタロチオネインの影響. メタロチオネイン99, 1999.
11. 柳沼 宏, 三浦伸彦, 有馬八重野, 花田勝美, 永沼 章: ヒノキチオールと亜鉛による相乗的なメタロチオネインの誘導. メタロチオネイン99, 1999.
12. 永沼 章: 重金属及び薬物毒性とメタロチオネイン. 第34回日本アルコール・薬物医学会総会, 1999.
13. 三浦伸彦, 千菊浩明, 宮入伸一, 内海英雄, 永沼 章:  $\gamma$ -GTP高発現細胞株の樹立とそれを用いた化学物質の腎毒性評価法の確立. 日本薬学会第119年会, 1999.
14. 永沼 章: 新しいメタロチオネイン研究の流れ. メタロチオネイン99, 1999.
15. 北 加代子, 三浦伸彦, 山崎健太郎, 吉田 稔, 永沼 章: ヒト腎皮質におけるメタロチオネイン遺伝子の翻訳領域及びプロモーター領域の塩基配列異常. 日本薬学会第120年会, 2000.
16. 三浦伸彦, 磯 輝行, 永沼 章: メタロチオネイン欠損細胞におけるカドミウムによる熱ショック蛋白質の誘導合成. 日本薬学会第120年会, 2000.
17. 村山珠樹, 加藤芳徳, 宮入伸一, 三浦伸彦, 永沼 章: 大腸菌を用いたマウスメタロチオネイン分子種のGST融合蛋白質としての発現系の開発. 日本薬学会第120年会, 2000.

## 研究成果

## 痙攣関連遺伝子の発現におけるメタロチオネインの役割

メタロチオネインは 1957 年にウマの腎臓から単離された分子量約 6,000 の金属結合蛋白質であり、構成アミノ酸の 1/3 をシステイン残基が占め、しかも S-S 結合を一つも持たないという非常に特徴的な構造を有している<sup>1)</sup>。本蛋白質は生物種間でよく保存されており、カビなどの真菌類からヒトをはじめとした哺乳類にまでその発現が認められる。メタロチオネインの生理作用としては、その分子中に豊富に存在する SH 基を介した重金属の毒性軽減作用やフリーラジカル除去作用がよく知られており、従って各種重金属や酸化ストレス誘起物質に対する重要な生体防御因子として機能しているものと考えられている。

ところで最近になって、メタロチオネインの一部が核内に移行するとの報告がなされた<sup>2)</sup>。そこで本研究申請者はメタロチオネインの新しい生理作用として他の遺伝子の発現制御を行なっている可能性を考え、メタロチオネイン遺伝子欠損マウス<sup>3)</sup> 及び対照の正常マウスの肝臓から不死化細胞株を樹立し、両細胞間で発現量の異なる遺伝子の検索をディファレンシャルディスプレイ法を用いて行なった。その結果、メタロチオネイン遺伝子欠損マウスでは発現が認められず、正常マウス由来の細胞でのみ発現している遺伝子 (NM31) が存在することを見いだした。メタロチオネイン遺伝子欠損細胞にメタロチオネイン遺伝子を再導入すると NM31 の発現が認められるようになることから、本遺伝子の発現にメタロチオネインが関わっている可能性が高いものと思われる。ところで NM31 は、ペンチレンテトラゾール (PTZ) によって誘発される痙攣発症に関与する遺伝子として同定・報告されている PTZ-17<sup>4)</sup> と同一であり、ヒトやラットおよびマウスの脳で高い発現が認められる。PTZ-17 は、PTZ を投与したマウスの脳で発現量が顕著に減少する遺伝子であり、神経細胞の初代培養系でも同様の現象が認められることが報告され

ている。痙攣発症時にはカルシウムの神経細胞内への流入が起こるが、PTZ-17の発現がカルシウムの流入を促進する<sup>5)</sup>ことから、PTZ-17は痙攣発症の鍵となる遺伝子の一つと考えられている。そこで本研究では、PTZなどの薬物によって誘発される痙攣発症におけるメタロチオネインの役割と意義を明らかにし、またNM31の発現におけるメタロチオネインの関与を検討した。

## 【材料及び方法】

### <細胞>

・MT(+): Ola 129/Sv マウスの肝臓から単離し、SV40 ウイルスの感染により SV40 ウイルス large T 抗原を導入して不死化した細胞。MT(-) 細胞の対照細胞として用いた。

・MT(-): メタロチオネイン遺伝子欠損マウスの肝臓から単離し、MT(+) 細胞と同様の方法で不死化した細胞。

・MT(-)/I&II: MT(-) 細胞に MT-I 及び -II 遺伝子を再導入した細胞。以下に作製方法を概略した。

・MT(-)/I: MT(-) 細胞に MT-I 遺伝子のみを導入し、MT-I 蛋白質のみを発現させた細胞。以下に作製方法を概略した。

・MT(-)/II: MT(-) 細胞に MT-II 遺伝子のみを導入し、MT-II 蛋白質のみを発現させた細胞。以下に作製方法を概略した。

・MT(-)/III: MT(-) 細胞に MT-III 翻訳領域を導入し、MT-III 蛋白質を発現させた細胞。本蛋白質の発現にはサイトメガロウイルスプロモーターを用いた。以下に作製方法を概略した。

### <MT-I&II 発現プラスミドの構築>

マウス MT-I および II 遺伝子を含む約 10kb のインサートを持つプラスミド (pKH<sup>6)</sup>, Fig. 5) はワシントン大学の Palmiter 博士から供与された。このプラスミドからマウス MT-I および II 遺伝子断片を単離し、ハイグロマイシン B 耐性を与えるハイグロマイシン B ホスホトランスフェラーゼ遺伝子をセレクションマーカーとして持つ発現ベクター (pcDNA3.1/Hygro $\alpha$ , Fig. 6) に組み込むことを計画した。なお、この発現ベクターは Invitrogen 社から購入したが、マルチクローニングサイトの上流にサイトメガロウィルスプロモーターを有している。今回、MT プロモーターの支配下に発現する MT の機能を調べることを目的としており、挿入する遺伝子には MT プロモーター領域が含まれている。そこで、この発現ベクターを Nru I および Nhe I で処理し、平滑末端化して連結することにより CMV プロモーター領域を除去したベクター (pcDNA3.1/Hygro $\alpha$ ) をまず作製した。次に pKH の Kpn I および EcoR V による部分切断で生じた 10 kb の断片をアガロースゲル電気泳動により単離し、GENE CLEAN III KIT (BIO101) により精製してマウス MT-I および -II を含む遺伝子断片を得た。得られた遺伝子断片を挿入するために、pcDNA3.1/Hygro $\alpha$  ベクターを Kpn I と EcoR V で切断後、アガロースゲルから単離精製して両者を DNA Ligation Kit Ver.2 (TAKARA) を用いて連結した。そのライゲーション溶液を、引き続き大腸菌へ導入した。大腸菌への導入は Hanahan らの方法<sup>7)</sup> に従って行った。コンピテントセル (XL-1 blue) 溶液 (200  $\mu$ l) に上述のライゲーション溶液 (10  $\mu$ l) を加え、氷上で 30 分間静置した後、42°C で 45 秒間の熱ショックを与え、さらに氷上で 2 分間静置した。これに SOC 培地 (2% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.05% NaCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM glucose) 0.8 ml を加え 42°C で 1 時間インキュベートした後、アンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含む LB 寒天培地 (1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl, 7% agar) に塗布し、37°C で一晩培養した。形成されたコロニーをアンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含む LB 培地 (1% bacto-tryptone, 0.5%



bacto-yeast extract, 1% NaCl) にて一晚振盪培養した後、Wizard Minipreps DNA Purification System を用いて大腸菌よりプラスミドを単離した。pcDNA3.1/Hygro $\alpha$  ベクターへの MT 遺伝子の挿入を確認するために、前述の制限酵素で切断し、確実に遺伝子断片を持つプラスミドを得た。得られたプラスミドを持つ大腸菌を大量培養し (100 ml)、QIAGEN Plasmid Maxi kit (QIAGEN) により MT-I&II 発現プラスミドを精製した。

#### < MT-I 発現プラスミド及び MT-II 発現プラスミドの構築 >

MT-I 遺伝子のみを含む断片は、pKH の Hind III による完全切断で生じた 5.4 kb 断片として単離した。pcDNA3.1/Hygro $\alpha$  ベクターを Hind III で消化後、アガロースゲルから単離精製し、ライゲーション反応を行った。また、MT-II 遺伝子のみを含む断片は pKH から Nde I で切り出し、生じた 3.8 kb 断片の両端を DNA Blunting Kit (TAKARA) を用いて平滑末端にした。pcDNA3.1/Hygro $\alpha$  ベクターを EcoR V で切断して平滑末端とし、上記の Ligation kit を用いて MT-II 遺伝子断片とライゲーションを行った。これらをそれぞれ大腸菌に導入し、上述の方法で挿入断片の確認及び各々の発現プラスミドの精製を行った。

#### < MT-III 発現プラスミドの構築 >

マウス MT-III の発現には、上述の pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen) ベクターのサイトメガロウイルスプロモーターの下流に MT-III 翻訳領域を挿入することにより行った。まず、マウス MT-III 翻訳領域を PCR 法により増幅した。即ち、Ola 129/Sv マウス的大脑から ISOGEN を用いて total RNA を抽出し、0.5 ml チューブに 3.0  $\mu$ g total RNA、0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l Oligo dT primer (1.0  $\mu$ l) およびイオン交換水を入れて全量を 12  $\mu$ l とし、70°C 10 分間の熱変性後、氷上で急冷した。次に、5x 1st strand Buffer (4.0

μl), 0.1M DTT (2.0 μl) および 10mM dNTP (1.0 μl) を添加して 37°C 5 分間保温後、200 unit/ml MMLV (Mouse Moloney Leukemia Virus) 逆転写酵素 (1.0 μl) を加え、タッピングで軽く混和して、37°C で 1 時間逆転写反応を行った。これを 70°C 15 分間処理して酵素を失活させた後、氷上で急冷した。さらに混入している RNA を切断するために、3.8 unit/ml RNaseH (0.26 μl) を加えて、37°C 20 分間反応した。次に、PCR 用の 0.5 ml チューブに、得られた cDNA (0.5 μl)、10 x PCR buffer (2 μl)、2mM dNTP (2 μl)、100 μM MT-III forward primer (0.2 μl)、100 μM MT-III reverse primer (0.2 μl) および Taq GOLD (0.2 μl ; Perkin Elmer) を加えて全量が 20 μl になるようにイオン交換水で調製し、95°C で 10 分間の加熱後、95°C 15 秒、60°C 30 秒、72°C 45 秒の増幅反応を 30 サイクル行うことにより PCR 産物を得た。これを、2% アガロースゲルで泳動し、PCR 産物の増幅を確認した。なお、用いたプライマーの配列を以下に記した。

MT-III forward primer : 5'-ATGGACCCTGAGACCTGCCCCCTG-3'

MT-III reverse primer : 5'-TCACTGGCAGCAGCTGCATTTCTCGGCCTCTGCCTTG-GCCCCCTC-3'

次に、PCR 産物を pGEM-T easy ベクター (Promega) に TA クローニング法により挿入した。即ち、増幅した PCR 産物 (2 μl)、50 ng の pGEM-T easy (1 μl) 及び DNA ligation kit (TAKARA) 添付の Solution I (3 μl) を混合し、16°C で一晩インキュベートした。この溶液を上述の方法で XL-1 に導入し、生えてきたコロニーを LB 培地で培養してプラスミドを単離した。得られたプラスミドを Eco RI で消化することにより挿入断片の確認を行い、PCR 断片の挿入が確認されたプラスミドについてシーケンスを行い塩基配列の確認を行った。正しい塩基配列を持つプラスミドを選

び、次に pcDNA3.1/Hygro ベクターへのサブクローニングを行った。即ち、プラスミドを Eco RI で消化して 2% アガロースゲル電気泳動を行い、挿入断片を上述の方法で単離精製した。同様に pcDNA3.1/Hygro ベクターを Eco RI で消化し、calf intestine alkaline phosphatase (Boehringer) による脱リン酸化処理を行った後、0.8% アガロースゲルで単離精製した。このベクター 50 ng と 5 倍モルの MT-III 断片をライゲーションした後 XL-1 に導入し、生えてきたコロニーを培養してプラスミドを単離し、MT-III 断片の挿入を Eco RI 処理により確認した。MT-III 断片が挿入されたプラスミドを持つ大腸菌を培養後、上述のように QIAGEN 精製を行った。

#### <各発現プラスミドの MT(-) 細胞へのトランスフェクション (Fig. 7)>

まず、100  $\mu$ l の FCS-free D'MEM に 4  $\mu$ l の TransIT™-LT1 試薬を滴下して軽く攪拌した後、室温で 5 分間以上放置し、さらに 2  $\mu$ g の各精製プラスミドを加え、室温で再び 5 分間以上放置して TransIT™-LT1 試薬とプラスミドの複合体を形成させた。6 穴プレートで 50 - 70% コンフルエントの状態の MT(-) 細胞を、トランスフェクション直前に PBS(-) で一度洗った後、FCS-free D'MEM に交換した。このプレートを軽く揺すりながら複合体溶液を滴下した後 4 時間培養し、その後、FCS を含む D'MEM 培地に交換して一晩培養した。この細胞を 1/10, 9/10 の割合で 55 cm<sup>2</sup> プレートに播き直し、一晩培養した後にハイグロマイシン B を 175  $\mu$ g/ml になるように添加して、1 - 2 週間後に生き残って増えてくる細胞を、メタロチオネイン遺伝子導入細胞とした。なお、これらの細胞のコントロールとして pcDNA3.1/Hygro $\alpha$  または pcDNA3.1/Hygro ベクターのみを導入した細胞も同時に作製した。

#### <メタロチオネイン遺伝子導入細胞の確認>

得られた各細胞を 55 cm<sup>2</sup> シャーレに 50 - 70% コンフルエントになるように培養

後、PBS(-) で一度洗い、ISOGEN 1 ml を加えて total RNA を抽出した。上述の方法で逆転写反応を行い、PCR により遺伝子導入の確認を行った。即ち、PCR 用の 0.5 ml チューブに、得られた逆転写産物 (0.5  $\mu$ l)、10 x PCR buffer (2  $\mu$ l)、2mM dNTP (2  $\mu$ l)、100  $\mu$ M forward primer (0.2  $\mu$ l)、100  $\mu$ M reverse primer (0.2  $\mu$ l) および Taq GOLD (0.2  $\mu$ l ; Perkin Elmer) を加えて全量が 20  $\mu$ l になるようにイオン交換水で調製し、95°C で 10 分間の加熱後、MT-I あるいは -II については 95°C 15 秒、53°C 30 秒、72°C 30 秒の増幅反応を 35 サイクル、MT-III については上述と同様のサイクルを行い、その産物を 10% ポリアクリルアミドゲルで泳動し、導入した MT 遺伝子が細胞の染色体上に組み込まれていることを確認した。なお、MT-I 及び -II の増幅に用いたプライマーの配列を以下に記した。

MT 344 primer : 5'-CACGACTTCAACGTCC-3'

MT 408 primer : 5'-CAGCAGGAGCAGCAGCTCTTCTTGCAG-3'

MT 409 primer : 5'-GTCCTAGAACTATTCAAAC-3'

344 と 408 の組み合わせにより 178 bp の MT-I cDNA のみが、また 408 と 409 の組み合わせにより 169 bp の MT-II cDNA のみが増幅される<sup>3)</sup>。

#### <ノーザンブロッティング>

2 x 10<sup>6</sup> 個の細胞を 55 cm<sup>2</sup> ディッシュに播いて一晩培養後、培地を捨て、10 ml の PBS(-) で細胞を洗浄した後 1 ml の ISOGEN (ニッポンジーン社製) を添加した。室温で 5 分間放置して細胞を溶解させ、その溶液を 1.5 ml チューブに移した。なお、臓器からの抽出には、臓器約 50 mg を 15 ml チューブに秤量後 1 ml の ISOGEN を加え、ホモジナイザーを用いて氷上で 1 分間ホモジナイズした後にホモジネートを 1.5 ml チューブに移した。次に、1.5 ml チューブにクロロホルム 200  $\mu$ l を加えて激しく攪拌 (20 秒間) し、室温で 5 分間放置した後、遠心 (15,000 rpm, 15 分

間) して、水層 (0.5 ml) を新しい 1.5 ml チューブに移した。ここに同量のイソプロパノールを加えて混和後、室温で 10 分間放置した。これを再び遠心 (15,000 rpm, 10 分間) し、沈殿した total RNA 画分を得た。この沈殿を 75% のエタノール溶液で洗浄し、乾燥後 TE 緩衝液 (10 mM Tris-1 mM EDTA) に溶解した。total RNA の収量は、260 nm における吸光度を基に算出した。total RNA (20 µg) にサンプルバッファー (6.4% ホルムアルデヒド、48% ホルムアミド、6.7% グリセリン、5.3% ブロムフェノールブルーを含む 1 x MOPS (20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate, 0.5 mM EDTA) バッファー) を加えて 65°C で 15 分間加熱変性させた後、泳動バッファーとして 1 x MOPS バッファーを用い、ホルムアルデヒド (2.2 M) を含む 0.8% アガロースゲル電気泳動 (100 V, 3.5 時間) を行なった。泳動終了後、10 x SSC (1.5 M NaCl, 150 mM sodium citrate) を用いてゲルから RNA を Nytran-N (S&S 社製) にトランスファーした。一晩トランスファー後、メンブランを 2 x SSC で 2 回洗浄し、その後乾燥して UV 照射により RNA を Nytran-N にクロスリンクして固定した。

#### <ハイブリダイゼーション>

DNA プローブのラベルは BcaBEST DIG Labeling Kit (TAKARA 社製) を用いて行なった。即ち、DNA プローブ (10 ng - 1 µg) と random primer (6 mer)、精製水を混合して 15 µl とし、熱変性 (95°C, 3 分間) した後氷水中で急冷した。そこに 2 µl の 10 x Buffer, 2 µl の DIG DNA Labeling Mix, 及び 1 µl の BcaBEST DNA Polymerase を加えて 50°C で 30 分以上反応させた。2 µl の Stop Solution を加えて反応を停止した後、Control DNA を用いて定量を行なった。

ハイブリダイゼーション、および検出はベーリンガー・マンハイム社のジゴキシゲニン (DIG) を用いた方法に従った。即ち、ポリエチレンバッグに入れたメンブランを高 SDS 濃度バッファー (7% SDS, 50% ホルムアミド, 5 x SSC, 2% ブロッキング

グ試薬, 50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.0), 0.1% N-ラウロイルサルコシナトリウム) 中で1時間以上プレハイブリダイズし、その後熱変性 (95°C, 15 分間) させた DIG-DNA プローブを含む (25 ng/ml) 高 SDS 濃度バッファーに交換して一晩ハイブリダイゼーションを行なった。メンブランを primary washing buffer (2 x SSC, 0.1% SDS) で室温で 5 分間、2 回洗浄した後、stringency washing buffer (0.1 x SSC, 0.1% SDS) で 68°C で 15 分間、2 回洗浄した。メンブランを Buffer 1 (0.15 M NaCl, 0.1 M maleic acid (pH 7.5)) で平衡化した後ポリエチレンバッグに入れ、Buffer 2 (ブロッキング試薬を Buffer 1 で 10 倍希釈) で室温で 30 分以上インキュベートした。次に、20,000 倍希釈した anti-DIG 抗体を含む Buffer 2 に交換し、室温で更に 30 分間インキュベートした。抗体溶液を捨て、メンブランを Buffer 3 (0.1 M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1 M NaCl) で平衡化した後、50 倍希釈した基質 (CDP-Star) を含む Buffer 3 をメンブラン上に均一に滴下し、メンブランをポリエチレンバッグにシールして X 線フィルムに露光した。

#### <MT 蛋白質の定量<sup>8)</sup>>

細胞を、6 穴プレートに 1 穴あたり  $3 \times 10^5$  個播き 24 時間培養後、各濃度の塩化亜鉛 (国産化学) または塩化カドミウム (和光純薬)、あるいはその溶媒であるイオン交換水を添加し、さらに 24 時間培養した。細胞を PBS(-) で洗浄した後、セルスクレイパーを用いて剥がし、1,500 rpm, 5 分間遠心して細胞を沈殿として集めた。ここに内部標準物質として N-propinylcysteamine dimer を含む 0.15M KCl 溶液 (500  $\mu$ l) を加えて、細胞をソニケーターを用いて氷上で超音波破碎した後に、沸騰水浴中で加熱 (5 分間) し、これを遠心 (3,000 rpm, 10 分間) して上清を得た。この加熱上清 (150  $\mu$ l) に 1M ホウ酸緩衝液 (350  $\mu$ l), 20% TBP (10  $\mu$ l ; tri-n-buthylphosphine, ナカライ) および 0.5% SBD-F (40  $\mu$ l ;

ammmonium-7-fluoro-2-benz-1,3-oxadiazole-4-sulfate, 同仁化学) を加えて、50°C で 30 分間加温し MT を SBD 誘導体化した後、4N 塩酸 (50  $\mu$ l) を加えて誘導体化反応を停止した。これを遠心 (2,800 rpm, 10分間) 後、その上清をイオン交換水で 10 倍希釈して蛍光検出 HPLC 法にて MT 濃度を測定した。即ち、HPLC システムとしてシステムコントローラー (SCL-10A) (SIMADZU)、オートサンプラー (SCL-10AxL) (SIMADZU)、マルチポンプ (LC-10AD) (SIMADZU)、蛍光検出器 (RF-10AxL) (SIMADZU) を用い、Shodex RSpak RP18-413 (昭和電工) と Puresil C18 (ウォーターズ) を連結して分離を行った。移動層には 20mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5): アセトニトリル: メタノール = 80:18:2 を用い、流速 0.7 ml/min で励起波長 384nm、検出波長 510nm における蛍光強度を測定した。なお、MT のスタンダードとして rabbit Metallothionein-II (Sigma) を用いた。細胞内 MT 濃度は、蛋白質 1 mg 当りの量として表わし、蛋白質の定量は Bradford 試薬 (Bio Rad) を用いた色素結合法により行った。

#### <細胞毒性測定法>

96 穴プレートに対象となる細胞を 1 穴あたり  $1 \times 10^4$  個/90  $\mu$ l の濃度になるよう播き、24 時間培養後、各濃度の各薬物溶液 10  $\mu$ l を添加して、さらに 24 時間培養した。細胞生存率は培地に Alamar Blue 溶液 10  $\mu$ l を加え、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で 2 時間培養した後に、蛍光プレートリーダーを用いて測定した (励起波長 544 nm, 検出波長 590 nm)。

#### <PTZ による痙攣発症試験>

12 - 16 週齢の雄の MT 遺伝子欠損マウス (MT-null) 及びその対照マウス (Ola 129/Sv) に 30 mg/kg, 75 mg/kg 及び 100 mg/kg の PTZ (ナカライ) を腹腔内投与した。



なお、PTZ は生理食塩水に溶解し、0.2 ml/20 g 体重の割合で投与を行った。またコントロール群は生理食塩水のみを腹腔内投与した。マウスに薬物を投与すると同時にタイマーをスタートし、間代性痙攣あるいは強直性痙攣が認められる最初の時間を記録した。

#### <PTZ による細胞傷害性試験>

96 穴プレートに対象となる細胞を 1 穴あたり  $1 \times 10^4$  個/90  $\mu$ l 培地 (D'MEM) の濃度になるよう播き、24 時間培養後、各濃度の PTZ 溶液 10  $\mu$ l を添加して、さらに 24 時間培養した。なお、PTZ は滅菌精製水に溶解し、また滅菌精製水のみを添加した群をコントロール群とした。PTZ 添加 24 時間後に培地を捨て、新たに培地で 10 倍希釈した Alamar Blue (Nalgene) 溶液 100  $\mu$ l を添加し、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で 2 時間培養した後に、蛍光プレートリーダーを用いて測定した（励起波長 544 nm, 検出波長 590 nm）。なお、Alamar Blue はミトコンドリアの呼吸鎖系により代謝（酸化）されて蛍光強度を増す試薬であり、細胞の酸化還元系を利用した MTT 法と同様の原理の細胞増殖測定試薬である。

#### <塩化亜鉛または PTZ による NM31 mRNA への影響>

MT(+) 及び MT(-) 細胞を 6 穴プレートに  $2 \times 10^5$  個播いて 24 時間培養後、精製水に溶解した塩化亜鉛を培地に添加した。亜鉛添加 3, 6, 12 そして 24 時間後に細胞から total RNA を抽出し、1 レーンあたりその 20  $\mu$ g の RNA をのせてノーザンブロット法により NM31 mRNA の発現量を調べた。また、PTZ による NM31 mRNA への影響は MT(+) 細胞を用いて調べた。即ち同様の方法で MT(+) 細胞を播き、精製水に溶解した PTZ（最終濃度 5, 10, 25, 50 mM）を添加して 30 分後および 60 分後に total RNA を抽出した。なお、プローブとしては NM31 whole を用いた。



### ＜マウス組織内 NM31 mRNA 発現量＞

10 - 12 週令の雄の 129/Sv マウス及び MT-null マウスをエーテル麻酔し、開腹して門脈から約 5 ml の生理食塩水を入れ、肝臓を灌流した。放血後、肝臓、大腦及び小脳を摘出し液体窒素に漬けて急速凍結し、超低温槽で保存した。total RNA の抽出には約 50 mg の組織を秤量して用いた。

### 【結果及び考察】

メタロチオネイン遺伝子欠損マウス及び対照の正常マウスの肝臓から樹立した不死化細胞株 (MT(-) 及び MT(+), Fig. 1) を用い、両細胞間で発現量の異なる遺伝子の検索をディファレンシャルディスプレイ (DD) 法により行なったところ、MT(-) 細胞では発現が認められず、MT(+) 細胞でのみ発現している遺伝子 (NM31) が存在することを見いだした (Fig. 2)。そこでこのバンドをゲルから切り出し、DD 法に用いたプライマーの組み合わせで PCR によりこのバンドを再増幅したのち、クローニングベクターに組み込んでシーケンスを行なった。その結果、本遺伝子の塩基配列 (288 base) はペンチレンテトラゾールによって誘発される痙攣発症に関与する遺伝子として同定・報告されている PTZ-17 の 3' 末の塩基配列と完全に一致した (Fig. 3)。そこで PCR により増幅した産物をプローブ (DD probe) として、両細胞におけるこの遺伝子 (NM31) の発現をノーザンブロット法により調べたところ、DD 法の結果と同様に MT(-) 細胞での発現はほとんど認められず、また PTZ-17 の cDNA 配列をもとに、上記の PCR 増幅領域を含まない領域 (whole probe)、あるいは PTZ-17 の翻訳領域 (ORF probe) を用いて同様にノーザンブロット法により NM31 の発現を調べたところ、これらのプローブを用いた場合でも本遺伝子の発現は MT(+) 細胞でのみ認められることが判明した (Fig. 4)。従って NM31 は PTZ-17

と同一であると考えられ、MT 蛋白質の欠損した細胞では本遺伝子の発現が消失することが判明した。

次に、NM31 の発現における MT の関与を調べるために、MT(-) 細胞に MT-I, II 遺伝子を導入して両蛋白質を再発現する細胞を樹立し、その細胞における NM31 の発現を調べてみた。まず、MT-I, II 遺伝子 (Fig. 5) を pcDNA3.1/Hygro $\alpha$  ベクター (Fig. 6) に組み込み、Fig. 7 に示した方法で MT(-) 細胞に導入して、本遺伝子を安定に発現する細胞をハイグロマイシンにより選択した。得られた細胞に目的の遺伝子が挿入されていることの確認は、RT-PCR 法で行なった。MT-I, II 欠損細胞は MT-I 及び -II 遺伝子部分にそれぞれストップコドンを含む余分な配列が挿入されており、そのために両 MT 蛋白質が発現しない。従って、この領域を増幅すると本来の遺伝子よりも大きな PCR 産物が生じる。そこで、RT-PCR 法を用いてそれぞれの細胞の MT 遺伝子を増幅し、PCR 産物の大きさを調べることにより、目的の遺伝子が細胞に導入されたかどうかを確認した。その結果、Fig. 8 に示すように両遺伝子を導入した細胞では、MT-I 及び -II 遺伝子産物はともに MT(-) 細胞のものよりも小さく、正常細胞である MT(+) 細胞と同一の大きさであったことから、両遺伝子が安定に導入されたものと考えられ、この細胞を MT(-)/I&II 細胞とした。また空ベクターを導入した細胞を MT(-)/V 細胞と呼ぶことにした。次に MT(-)/I&II 細胞における MT 蛋白質の合成を確認するために、強力な MT 誘導剤である塩化亜鉛を細胞の培地に添加した後、細胞内 MT 蛋白質濃度を HPLC 法で測定した。その結果、MT(-)/I&II 細胞では MT(+) 細胞と同様に塩化亜鉛の濃度依存的に MT 蛋白質の合成が誘導されることが確認された (Fig. 9)。そこでこの細胞における NM31 の発現をノーザンブロット法に調べたところ、MT(-) 細胞で消失していた NM31 の発現は MT(-)/I&II 細胞では MT(+) 細胞レベルにまで回復した (Fig. 10)。このことから NM31 の発現調節には MT-I, II 蛋白質が深く関わっている可能性が示唆された。

ところで MT-I 及び -II の 2 つの分子種は、マウスのほとんど全ての臓器でその発現が同程度に認められることが知られている。両分子種ともに 61 個のアミノ酸で構成され、アミノ酸ホモログ (identity) は 67% であり、1 分子中に含まれる 20 個のシステイン残基の位置は一致している。この様な非常に類似した構造を有する分子種が同様の体内分布を示すことから、各々の機能が異なる可能性が考えられる。そこで MT(-) 細胞に MT-I 遺伝子のみ、あるいは MT-II 遺伝子のみを導入し、それぞれの蛋白質を単独に発現する細胞の樹立を試みた。Fig. 5 に示した MT-I または MT-II 遺伝子領域を適当な制限酵素で切り出し、pcDNA/Hygro $\alpha$  ベクターに組み込んだのち MT(-) 細胞に導入してそれぞれを安定に発現する細胞 (MT(-)/I, MT(-)/II) を得た。両細胞におけるそれぞれの遺伝子の発現は上述と同様の RT-PCR 法により確認した (Fig. 11)。その結果、MT(-)/I 細胞では MT-I 遺伝子産物のみに MT(+) 細胞と同一分子量の PCR 産物が認められ、逆に MT(-)/II 細胞では MT-II 遺伝子産物が MT(+) 細胞と同じ大きさであった。また塩化亜鉛による MT 蛋白質の誘導合成はそれぞれの細胞で同程度に認められた (Fig. 12)。従って MT(-)/I または MT(-)/II 細胞にはそれぞれの遺伝子が安定に導入され、亜鉛による誘導も同程度に生じることが判明した。そこでこれらの細胞における NM31 の発現をノーザンブロット法により調べたところ、MT(-)/II 細胞では MT(-)/I&II 細胞よりは弱いものの NM31 の発現の回復が認められたが、MT(-)/I 細胞ではほとんど認められなかった (Fig. 13)。このことから NM31 の発現には MT-II 分子種の存在が必須であり、MT-I の存在により発現がさらに促進される可能性が考えられる。また MT-I と -II の機能の違いを示唆している可能性もあることから、この現象については更に解析を進めていく予定である。

マウスの MT には MT-I, II 分子種の他に MT-III, MT-IV の存在が報告され、それぞれ 68 アミノ酸または 62 アミノ酸から構成されている。これら 2 つの分子種の

発現には組織特異性があり、MT-III は脳で、MT-IV は舌や扁平上皮で発現が認められる。PTZ-17 はヒトやマウスの脳で特に高く発現していることから、次に MT-III 分子種の NM31 発現への関与を調べた。MT-III 翻訳領域を RT-PCR 法により増幅し、サイトメガロウイルスプロモーターを持つプラスミド (pcDNA3.1/Hygro) の下流に組み込んだのち MT(-) 細胞に導入した。なお、MT(-) 及び MT(+) 細胞は肝臓由来の細胞であり、MT-III の発現は認められない (Fig. 14)。MT-III 発現プラスミドを導入した細胞をハイグロマイシンにより選択し、得られた細胞における MT-III 遺伝子の発現を RT-PCR 法により確認して (Fig. 14)、MT-III 安定発現細胞 (MT(-)/III) とした。この細胞における NM31 の発現を調べた結果、MT(-)/I&II 細胞と同様に MT(+) 細胞レベルにまでその発現は回復した (Fig. 15)。従って NM31 は MT-I, -II だけではなく MT-III によっても何らかの形で発現制御を受けている可能性が強く示唆された。

ところで上述のように MT は塩化亜鉛などの重金属によって誘導合成されることが知られている。そこで次に MT の細胞内濃度を上昇させた時の NM31 発現レベルの変動について調べた。MT(+) 及び MT(-) 細胞を塩化亜鉛で処理し、その 3, 6, 12 そして 24 時間後に細胞から total RNA を抽出してノーザンブロットを行ない、マウス MT-I cDNA, ヒト GAPDH 及び NM31 whole をプローブとしてそれぞれの遺伝子の発現を調べたところ (Fig. 16)、両細胞において、MT は時間依存的に発現量が上昇し、亜鉛添加 12 時間後にピークとなった。一方、MT(-) 細胞では NM31 の発現は消失しており、また亜鉛添加による発現の増加は認められなかったが、MT(+) 細胞において、変動は少ないものの NM31 の発現量は亜鉛添加による減少が観察された。Fig. 9 の結果から MT 蛋白質は亜鉛添加 24 時間後には上昇しており、従って NM31 の発現レベルは MT の細胞内濃度が減少しても、または増加しても抑制される可能性も考えられる。

また、PTZ 添加による NM31 の変動を調べてみた。MT(+) 細胞に 5, 10, 25 または 50 mM の PTZ を添加し、その 30 分後あるいは 60 分後に細胞から RNA を抽出してノーザンブロット法により NM31 の発現量を調べたところ (Fig. 17)、50 mM の PTZ 添加群で両時間において発現量の低下が認められた。従って NM31 はマウス肝臓由来の MT(+) 及び MT(-) 細胞においても PTZ による負の制御を受けていることが示唆された。

次に、MT(+) 及び MT(-) 細胞における PTZ の細胞毒性を調べてみた。両細胞を 96 穴プレートに播いて一晚培養後、PTZ (最終濃度 10-60 mM) または塩化カドミウム (最終濃度 20-100  $\mu$ M) を培地に添加し、その 24 時間後の細胞生存率をアラマーブルー法により調べた。その結果、MT が細胞毒性を軽減することが知られているカドミウムに対し、MT を欠損した MT(-) 細胞は MT(+) 細胞に比べて高い感受性を示したのに対し、PTZ に対する感受性は両細胞で同程度であった (Fig. 18)。NM31 は PTZ が引き起こす痙攣発症に関与する遺伝子として同定されている PTZ-17 と同一であるが、NM31 の発現が認められない MT(-) 細胞の PTZ に対する感受性が MT(+) 細胞と同様であることから、NM31 の発現は少なくとも用いた培養細胞において PTZ の細胞毒性には影響を与えないものと思われる。

さらに、MT 遺伝子欠損マウスを用いて PTZ の痙攣発症における影響を調べてみた。MT 遺伝子欠損マウス (MT-null) 及び対照の正常マウスである 129/Sv マウスに 30 mg/kg, 75 mg/kg または 100 mg/kg の PTZ を腹腔内投与し、投与と同時にタイマーをスタートさせ痙攣が最初に認められる時間を比較した。その結果、Table 1 に示すように 30 mg/kg の PTZ 投与ではマウスの死亡も痙攣も認められなかったが、75 mg/kg で投与 60 秒前後に間代性痙攣が生じ、その後強直性痙攣が現れすべてのマウスが死亡した。その効果に対し、両系統のマウスで違いは認められなかった。100 mg/kg の PTZ では投与 50 秒後までに強直性痙攣とともにマウスは死亡し、同

様に MT の有無で違いは認められなかった。

以上の結果から PTZ の細胞毒性及び痙攣発症に対して NM31 は直接関与していない可能性が考えられるが、上述のようにマウスで確認されている 4 つの MT 分子種のうち MT-III は脳で特異的に発現が認められることが知られている。Fig. 15 に示したように NM31 の発現は MT-I, II のみならず MT-III によっても回復する。また、MT-null 及び 129/Sv マウスの脳における NM31 の発現に差は認められなかった (Fig. 19) ことから、MT-I, -II を発現している肝臓においては両遺伝子の欠損により NM31 の発現が消失するが、MT-I, -II に加えて MT-III が発現している大脳及び小脳においては、MT-III による制御を受け、NM31 の発現に変動が生じないのかもしれない。

PTZ-17 はペンチレンテトラゾール投与後、早い時期にマウスの脳でその発現が減少する遺伝子として同定<sup>4)</sup>され、本遺伝子の転写産物を *xenopus oocytes* で発現させるとカルシウムの流入量が増大することが報告されている<sup>5)</sup>。痙攣発症時には細胞内カルシウム濃度の変動が生じることから、PTZ-17 は痙攣に関わる遺伝子として注目されている。我々は偶然にも MT 遺伝子欠損により発現が消失する遺伝子 NM31 が PTZ-17 と同一のものであることを見だし、MT と痙攣発症の関わりについて検討を行った。特に MT 欠損マウス個体において、PTZ 誘発痙攣に対する感受性が高まることが期待されたが、痙攣発症までの時間を指標にした本検討ではその感受性に違いは認められなかった。上述のように NM31 の発現は MT-I 及び MT-II 分子種により正の制御を受けると考えられるが、これら 2 つの分子種のみならず脳で特異的に発現している MT-III によっても発現が制御されていることが判明した。今回用いた MT 遺伝子欠損マウスは MT-I, -II 分子種の発現は欠損しているものの MT-III 分子種は正常に転写・翻訳されており、従って脳内の NM31 の発現量は両系統のマウスで同様であると考えられる。今後、MT-III 遺伝子欠損マウ

スを早急に作製し、NM31 の脳における発現及び PTZ 等の痙攣誘発物質に対する感受性などを調べていく予定である。

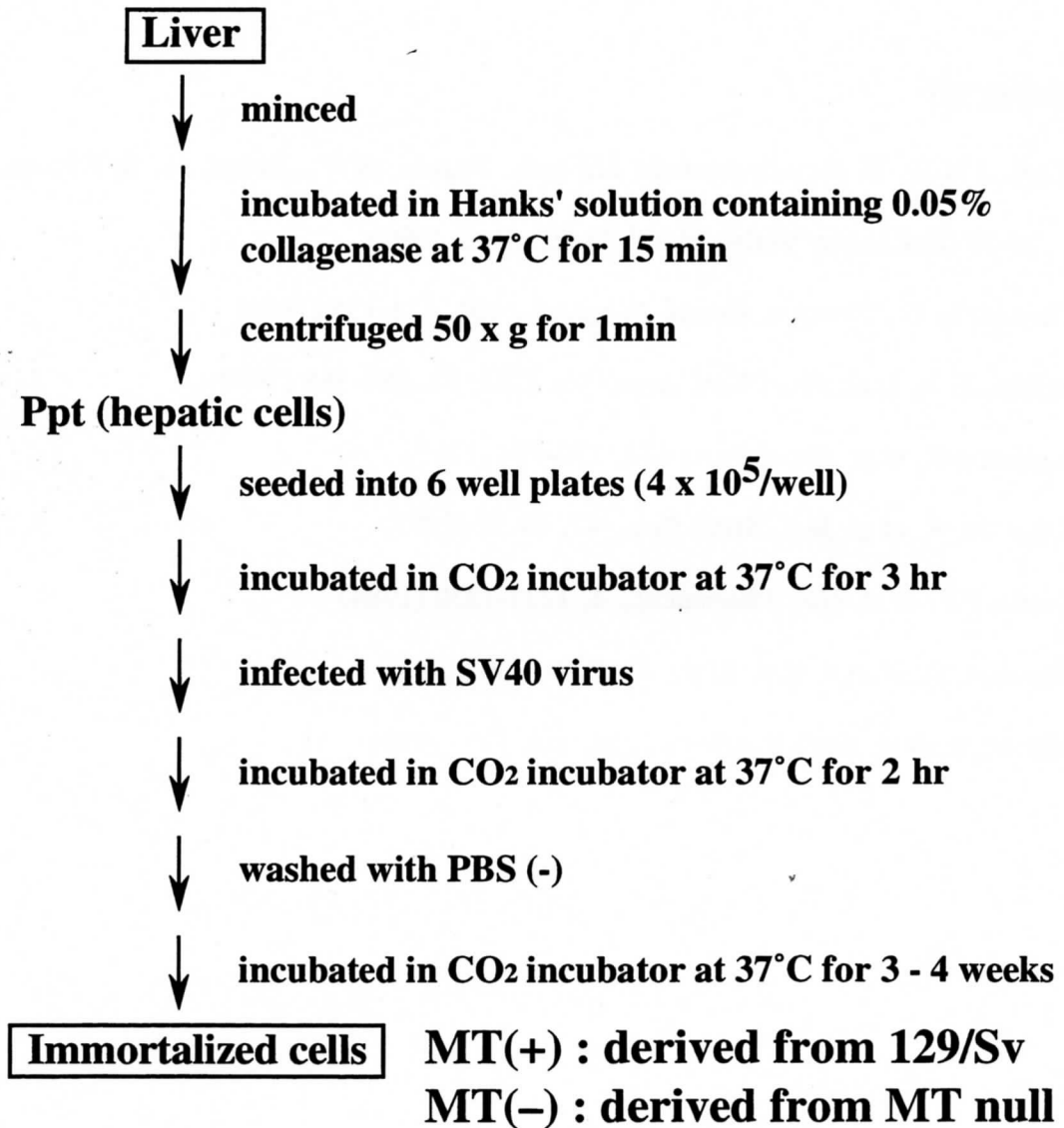
#### 【参考論文】

1. Kagi, J.H.R. in *Metallothionein III* (eds. Suzuki, K.T., Imura, N. & Kimura, M), 29-55 (Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1993)
2. Cherian, M.G., *Environ. Health Perspect.*, 102, 131-135 (1994)
3. Masters, B.A. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 584-588 (1994)
4. Kajiwara, K. et al, *Brain Res.*, 671, 170-174 (1995)
5. Kajiwara, K. et al, *Mol. Brain Res.*, 47, 49-58 (1997)
6. Searle, P.F. et al, *Mol. Pharmacol.*, 4, 1221-1230 (1984)
7. Hanahan, D. et al, *J. Mol. Biol.*, 4, 1221-1230 (1983)
8. Miyairi, S. et al, *Anal. Biochem.*, 258, 168-175 (1998)





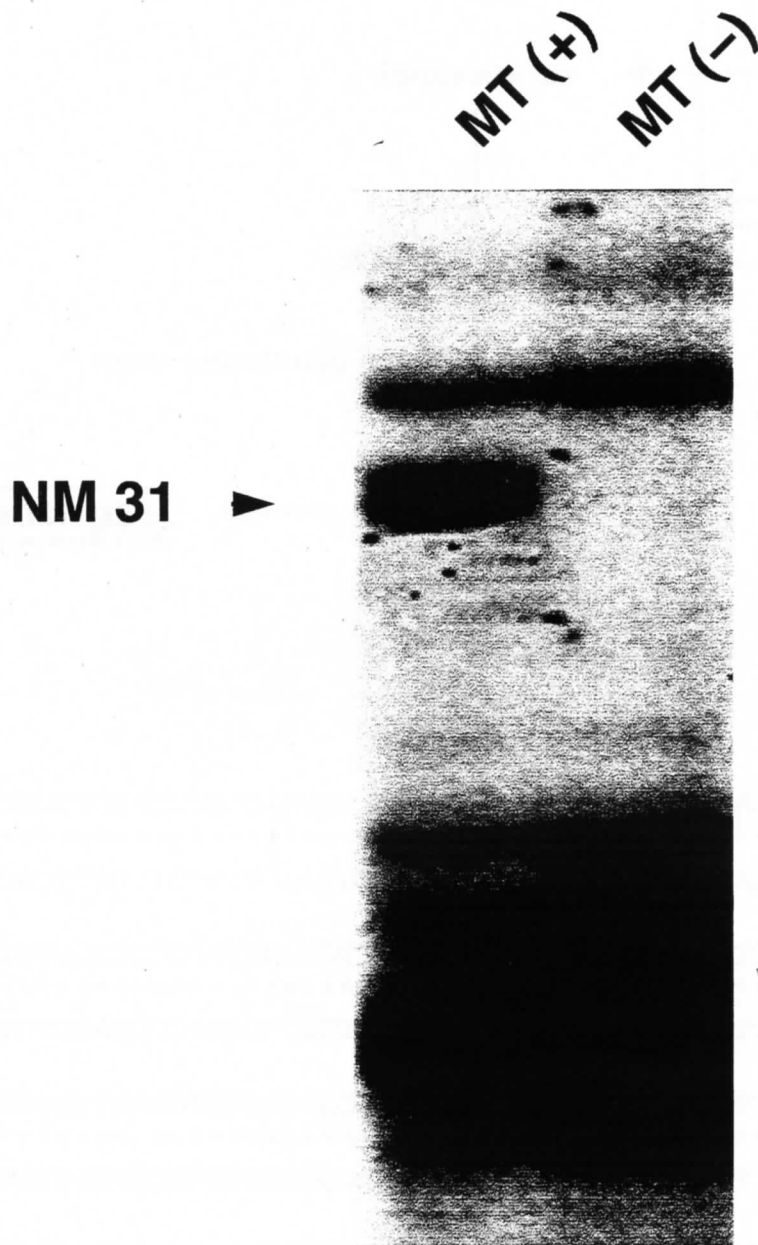
- 129/Sv
- MT null



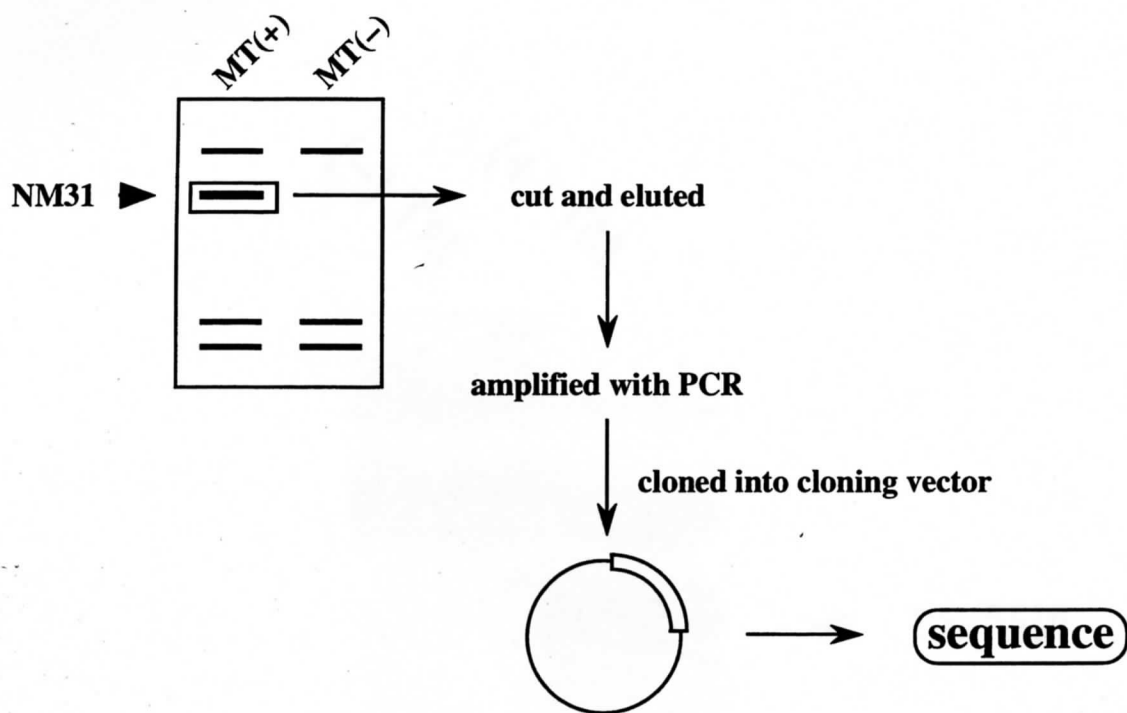
medium : D'MEM + 10% FCS +  $\left[ \begin{array}{l} 1 \times 10^{-5} \text{M dexamethasone} \\ 10 \text{ ng/ml insulin} \\ 100 \text{ ng/ml EGF} \end{array} \right]$

**Fig. 1**  
**Establishment of Immortalized Cells**  
**Derived from Mouse Liver**





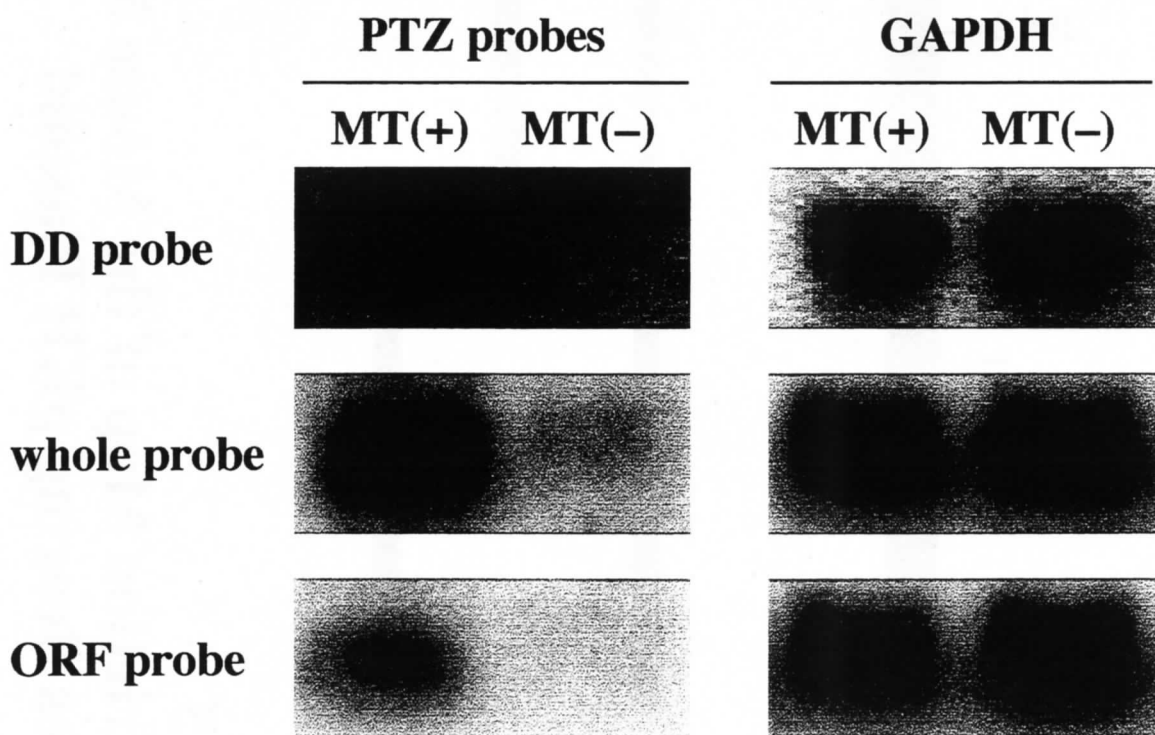
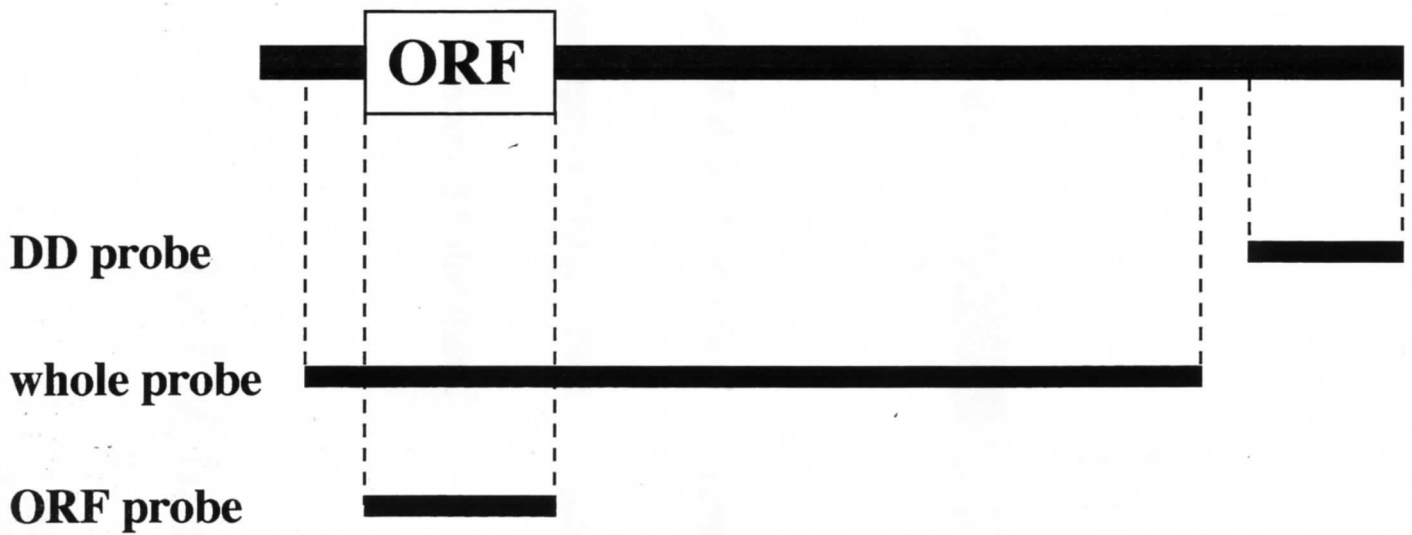
**Fig. 2**  
**Differential Display of cDNA using Total**  
**RNA from MT (+) and MT (-) Cells**



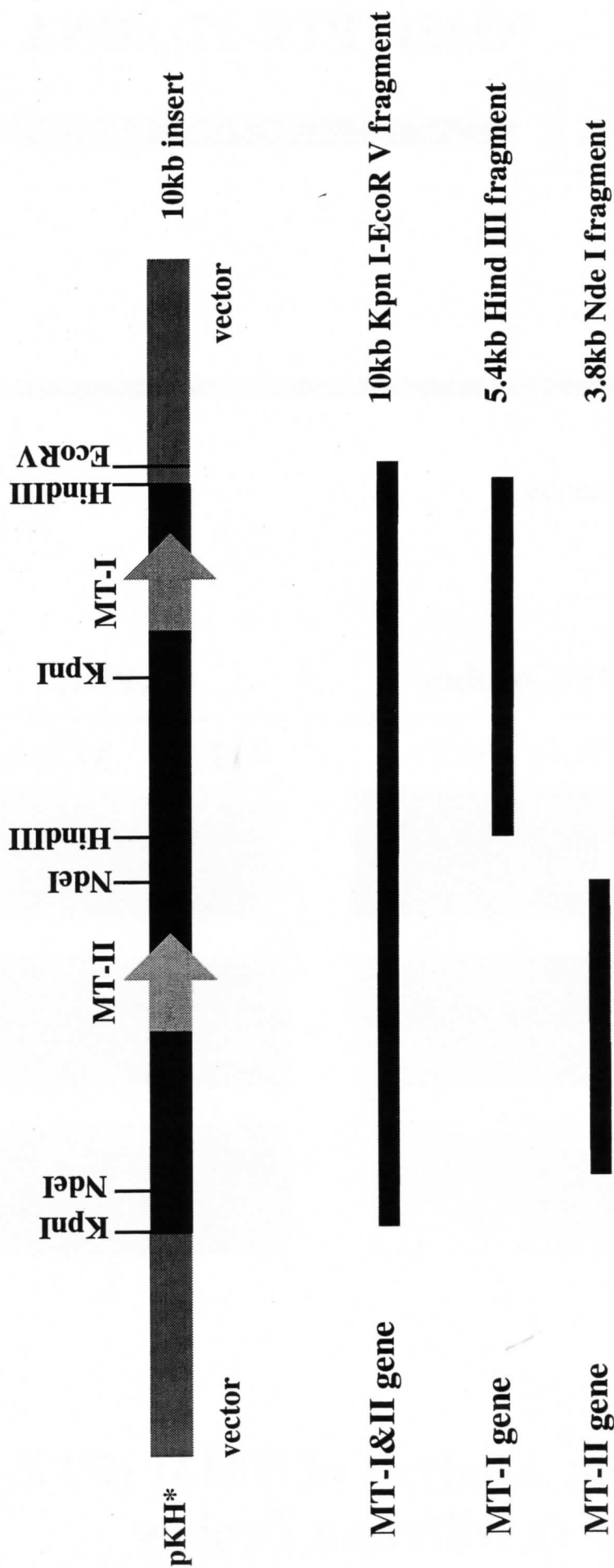
<b>PTZ-17</b>	1321'	TTGCGCTTCTGACTGTAAACACCAATGATGCATGCACTGTCCCTCTTCACTCTTTCTCT
		*****
<b>NM31</b>	1"	GACTGTAAACACCAATGATGCATGCACTGTCCCTCTTCACTCTTTCTCT
<b>PTZ-17</b>	1381'	CGCTTCCCCTCTGGCTTGAGTTTCTTGTGCATTCTCGCTACCCCCACCTCTGTTAGGGTA
		*****
<b>NM31</b>	51"	CGCTTCCCCTCTGGCTTGAGTTTCTTGTGCATTCTCGCTACCCCCACCTCTGTTAGGGTA
<b>PTZ-17</b>	1441'	GGTATATCAGCTATGTAAATAAAGCAAGGAAACGGTATTGTGCATTGTGGCATTATGTA
		*****
<b>NM31</b>	111"	GGTATATCAGCTATGTAAATAAAGCAAGGAAACGGTATTGTGCATTGTGGCATTATGTA
<b>PTZ-17</b>	1501'	GAATTGCAGTGTGCGCTGCCGAAAATGCAGGCTTTTGTAACGTGGTCCTCTCATAAGTAC
		*****
<b>NM31</b>	171"	GAATTGCAGTGTGCGCTGCCGAAAATGCAGGCTTTTGTAACGTGGTCCTCTCATAAGTAC
<b>PTZ-17</b>	1561'	CCAATGTATTTTAGCTATTTTAGTAGGATTGTTCATAAATATGCAAGCTATAAGGT
		*****
<b>NM31</b>	231"	CCAATGTATTTTAGCTATTTTAGTAGGATTGTTCATAAATATGCAAGCTATAAGGT

**Fig. 3**  
**Sequence Coincidence of PTZ-17 and NM31**

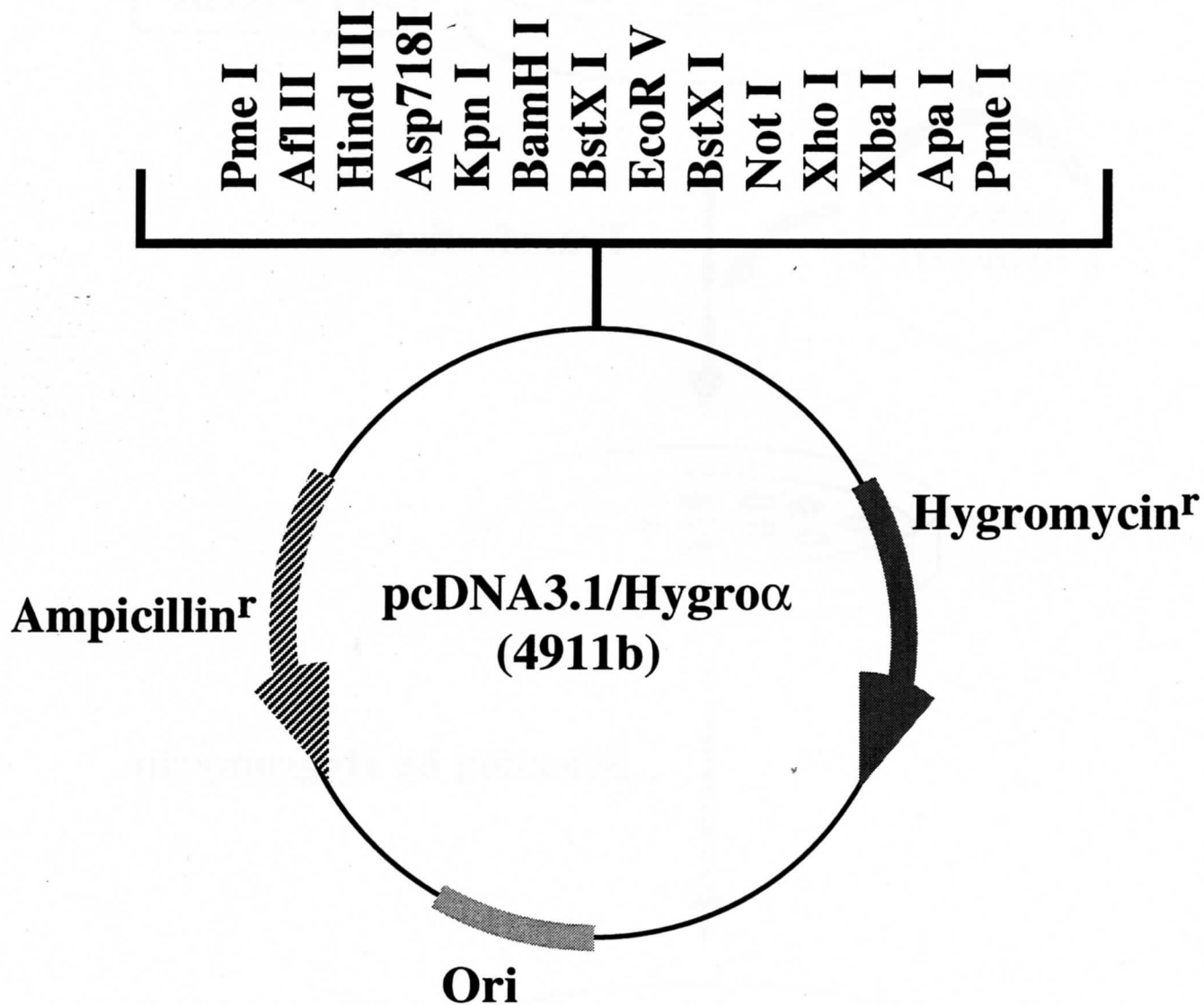
# NM31 (PTZ-17) cDNA



**Fig. 4**  
**Northern Blot Analysis of NM31 (PTZ-17)**  
**cDNA by Three Different Probes**

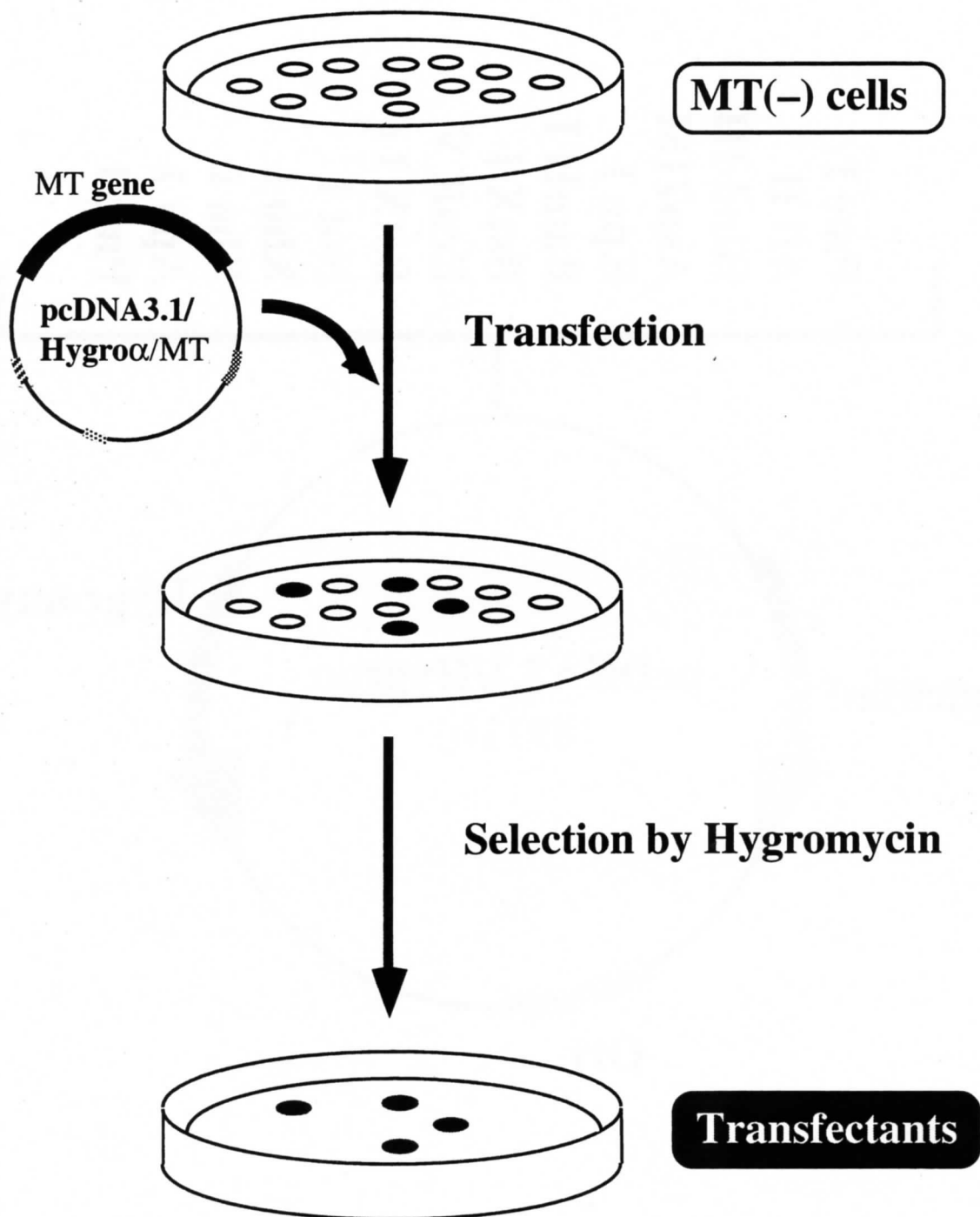


**Fig. 5**  
**Restriction Map of the Mouse MT-I and MT-II**  
**Genes Bearing pKH Plasmid**



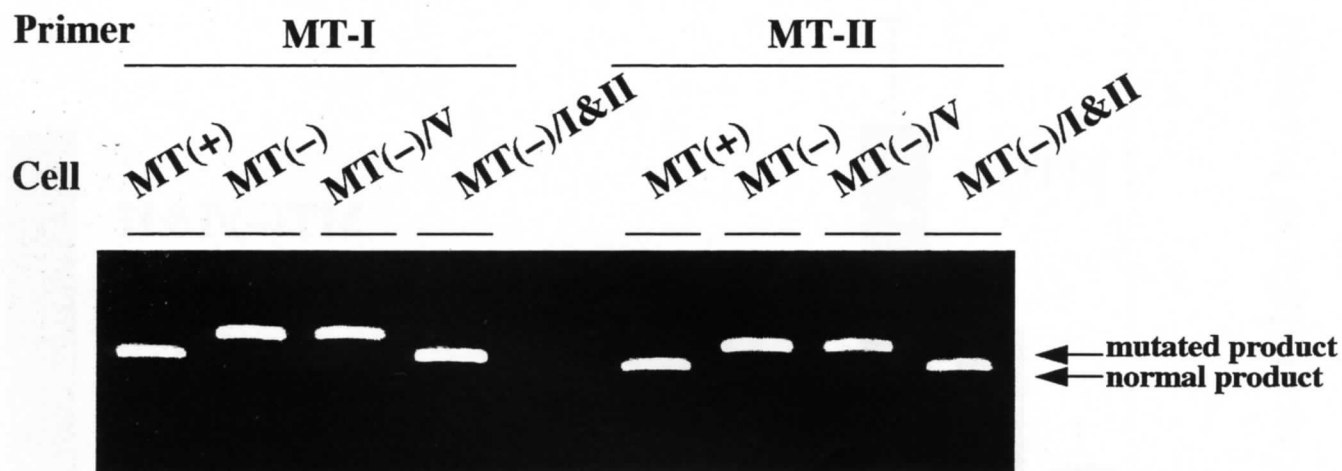
**Fig. 6**

**Structure of the pcDNA3.1/Hygro $\alpha$  Vector**



**Fig. 7**  
**Transfection of MT Gene(s) to MT(-) Cells**

## RT-PCR



MT(+) : Cells obtained from liver of normal mouse

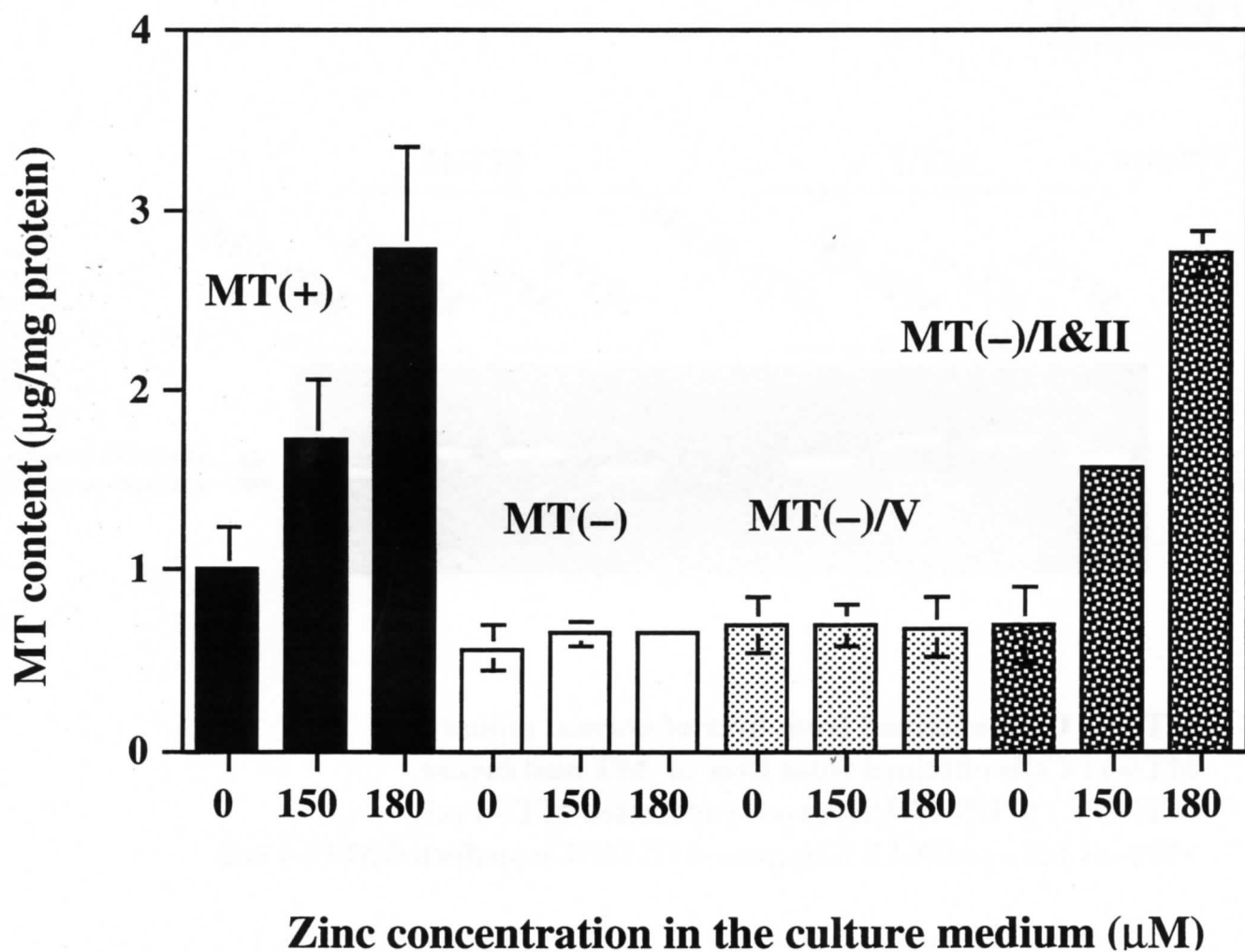
MT(-) : Cells obtained from liver of MT null mouse

MT(-)/V : pcDNA3.1/Hygroα transfected MT(-) cell

MT(-)/I&II : pcDNA3.1/Hygroα-MT-I&II transfected MT(-) cell

### Fig. 8

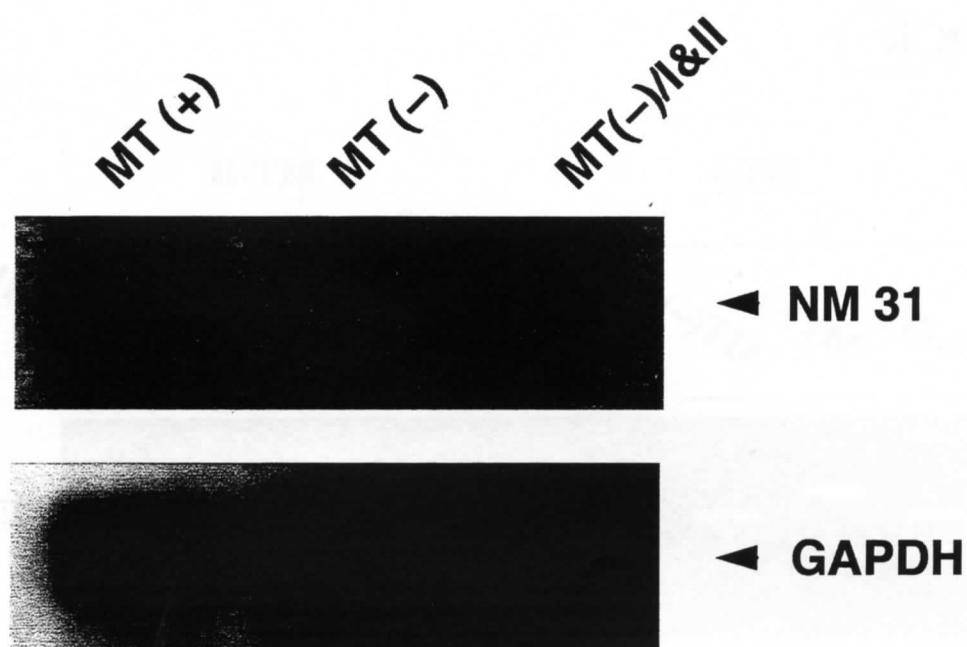
Expression of MT-I or MT-II mRNA in MT(+), MT(-) and MT(-)/I&II Cells



**Fig. 9**

**Induction of Metallothionein (MT) Proteins in MT-I&II Genes Transfected Cells by Zinc**





**MT(+)** : Cells obtained from liver of 129/Sv mouse

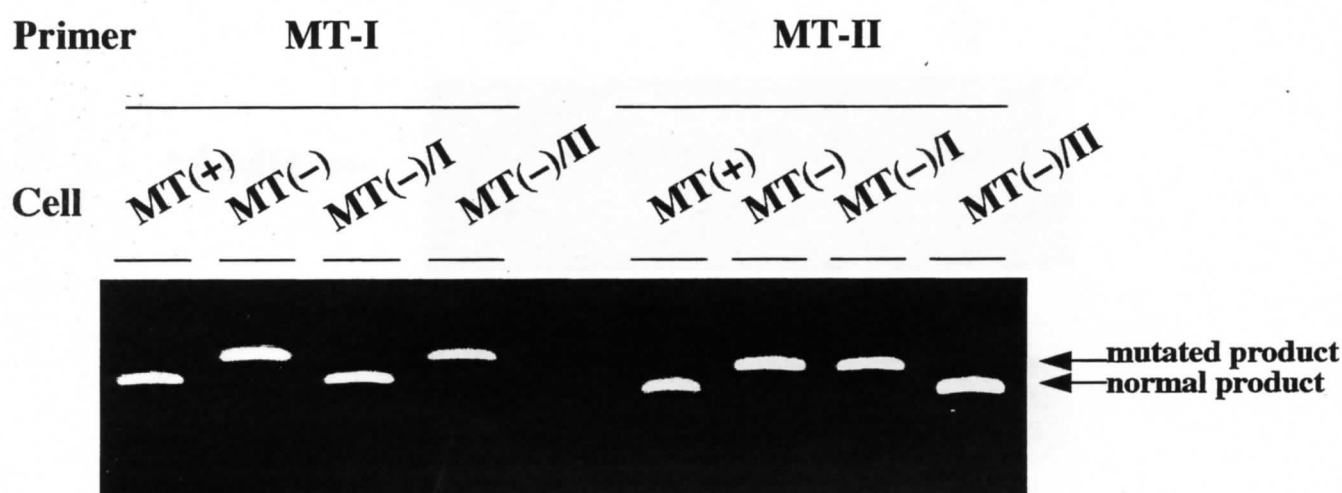
**MT(-)** : Cells obtained from liver of MT-null mouse

**MT(-)/I&II** : pcDNA3.1/Hygro $\alpha$ -MT-I&II transfected MT(-) cell

## **Fig. 10**

**Expression of NM31 Specific RNA in  
MT (+), MT (-) and MT(-)/I&II Cells**

## RT-PCR



**MT(+)** : Cells obtained from liver of 129/Sv mouse

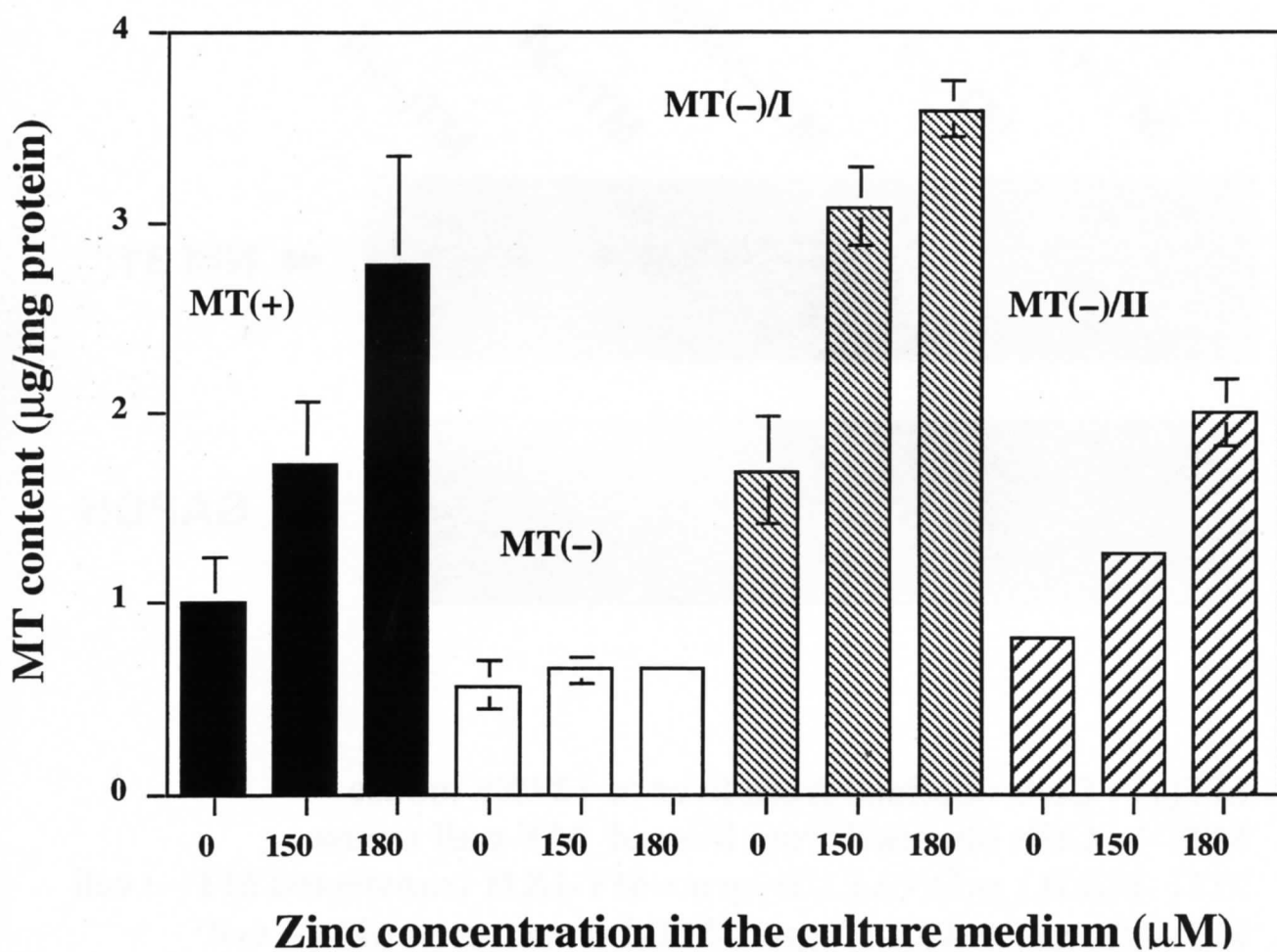
**MT(-)** : Cells obtained from liver of MT-null mouse

**MT(-)/I** : pcDNA3.1/Hygro $\alpha$ -MT-I transfected MT(-) cell

**MT(-)/II** : pcDNA3.1/Hygro $\alpha$ -MT-II transfected MT(-) cell

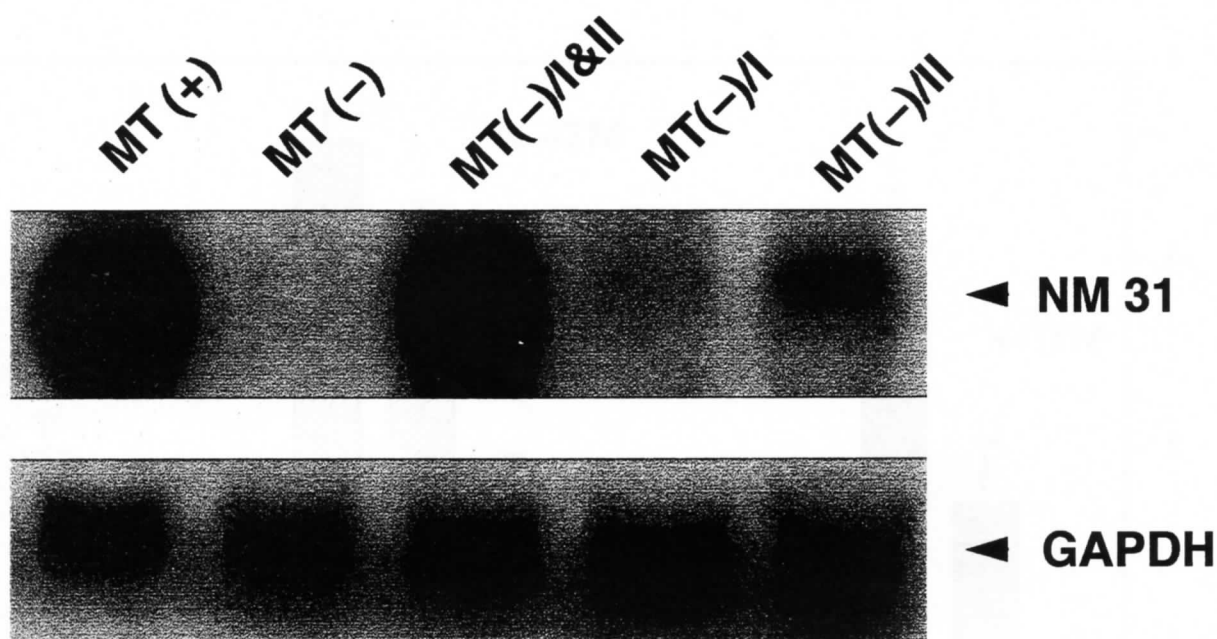
**Fig. 11**

**Expression of MT-I or MT-II mRNA in MT(+), MT(-), MT(-)/I and MT(-)II Cells**



**Fig. 12**

**Induction of Metallothionein (MT) Proteins in MT-I&II Genes Transfected Cells by Zinc**



**MT(+)** : Cells obtained from liver of 129/Sv mouse

**MT(-)** : Cells obtained from liver of MT-null mouse

**MT(-)/I&II** : pcDNA3.1/Hygro $\alpha$ -MT-I&II transfected MT(-) cell

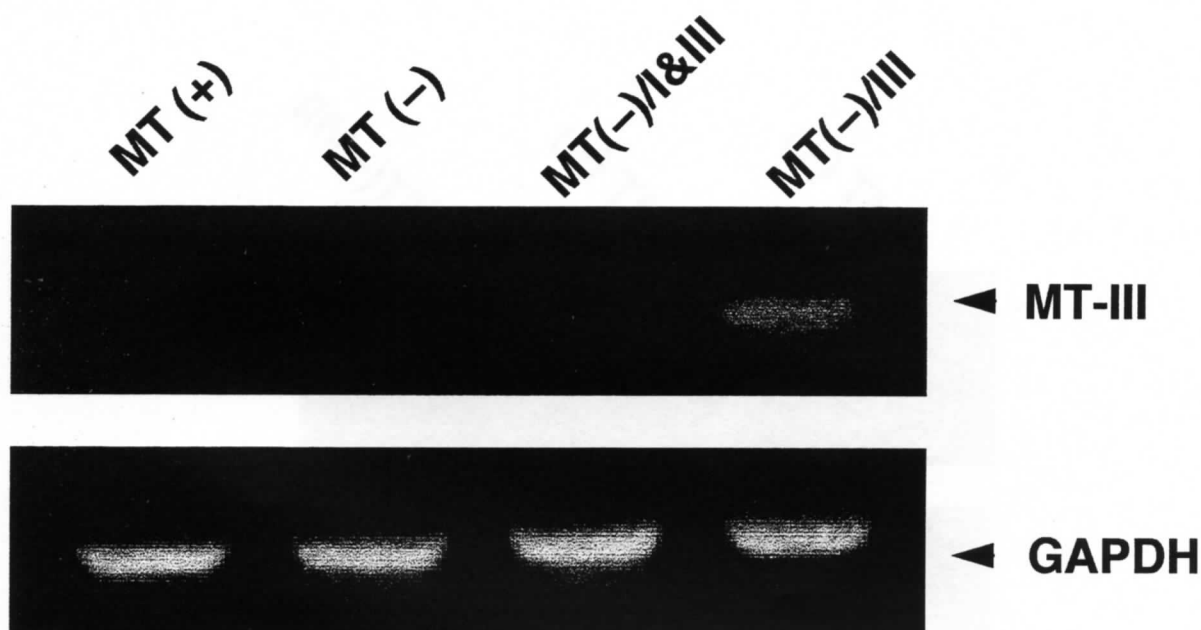
**MT(-)/I** : pcDNA3.1/Hygro $\alpha$ -MT-I transfected MT(-) cell

**MT(-)/II** : pcDNA3.1/Hygro $\alpha$ -MT-II transfected MT(-) cell

**Fig. 13**

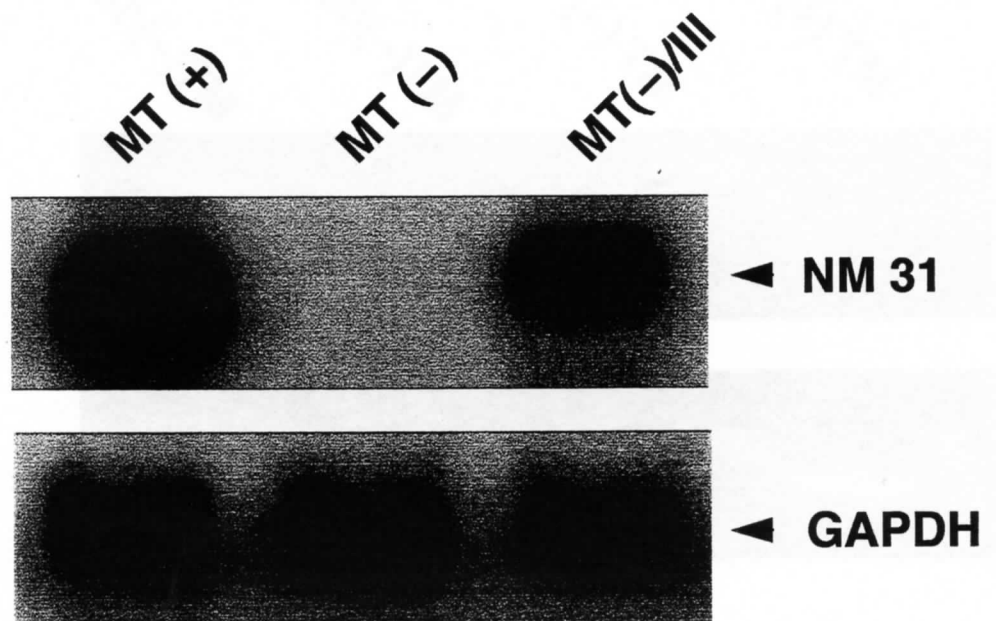
**Expression of NM31 Specific RNA in  
MT (+), MT (-) and MT(-)/pKH Cells**

**RT-PCR**



**MT(+)** : Cells obtained from liver of 129/Sv mouse  
**MT(-)** : Cells obtained from liver of MT-null mouse  
**MT(-)/I&II** : pcDNA3.1/Hygro $\alpha$ -MT-I&II transfected MT(-) cell  
**MT(-)/III** : pcDNA3.1/Hygro-MT-III transfected MT(-) cell

**Fig. 14**  
**Expression of MT-III mRNA in MT-III**  
**Transfected MT(-) Cells**



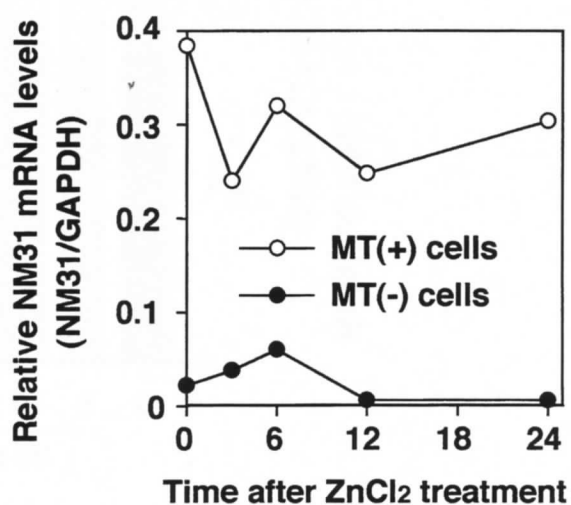
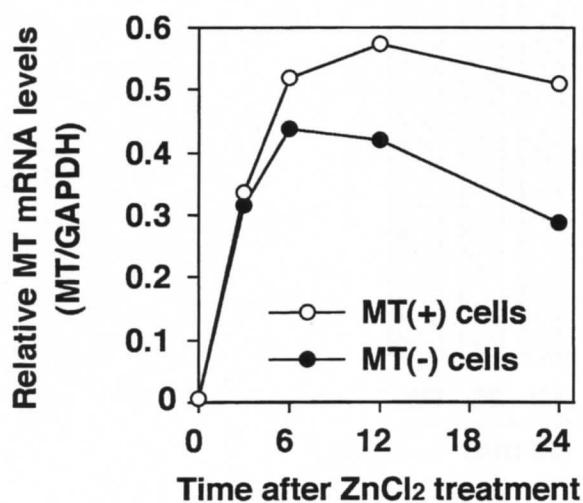
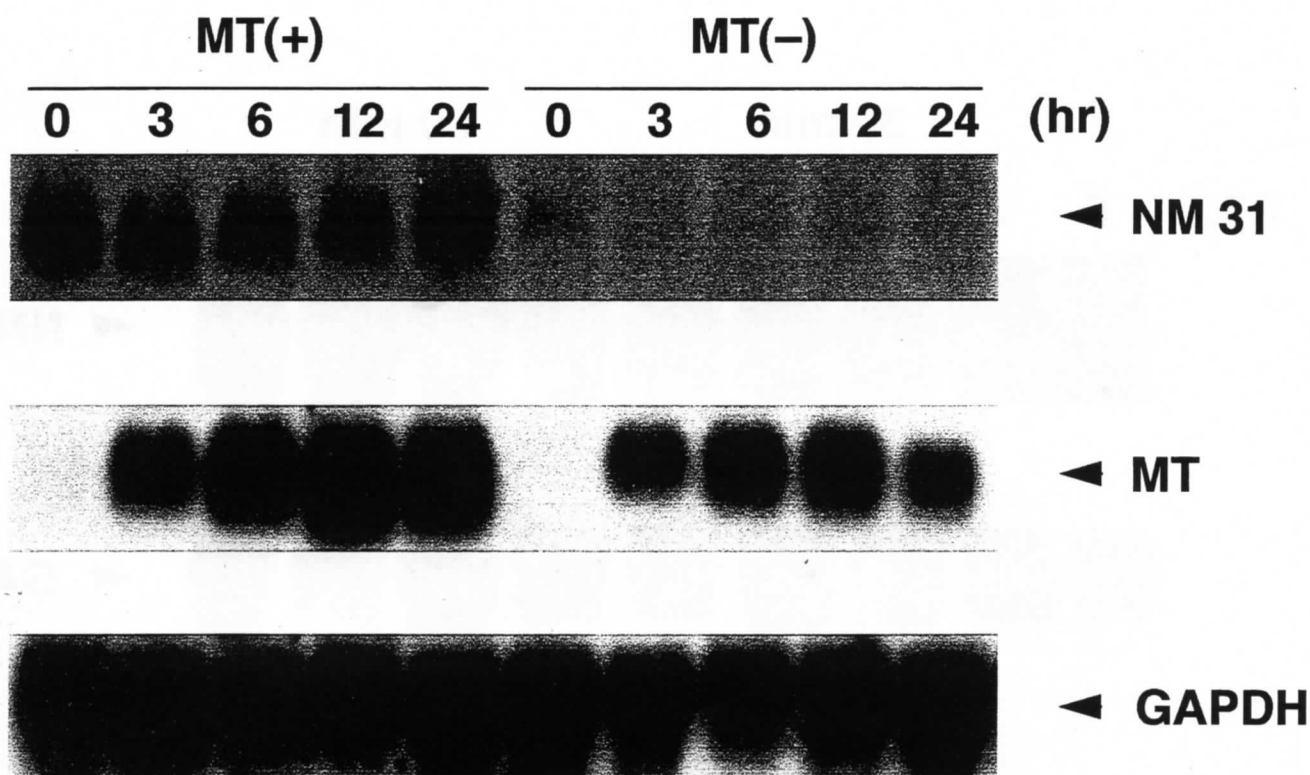
**MT(+)** : Cells obtained from liver of 129/Sv mouse

**MT(-)** : Cells obtained from liver of MT-null mouse

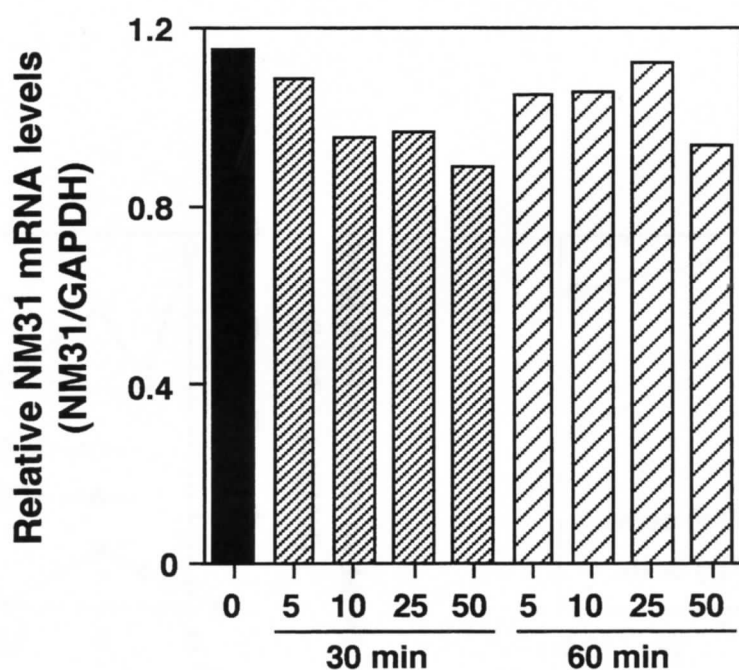
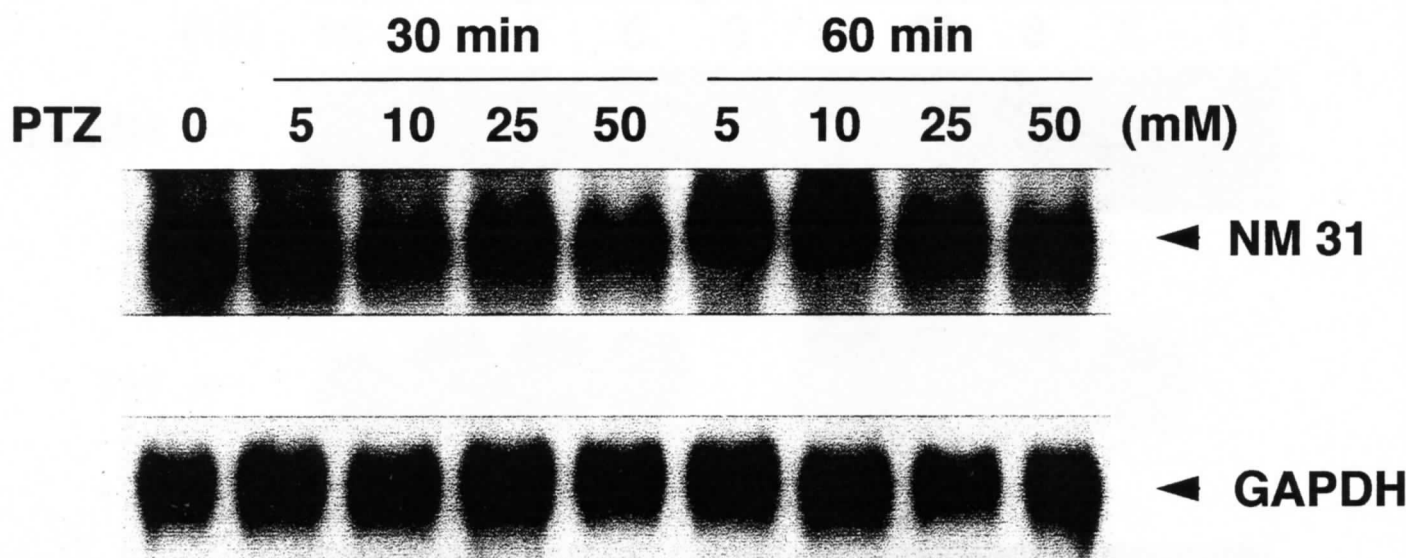
**MT(-)/III** : pcDNA3.1/Hygro-MT-III transfected MT(-) cell

### **Fig. 15**

**Expression of NM31 Specific RNA in  
MT (+), MT (-) and MT(-)/III Cells**



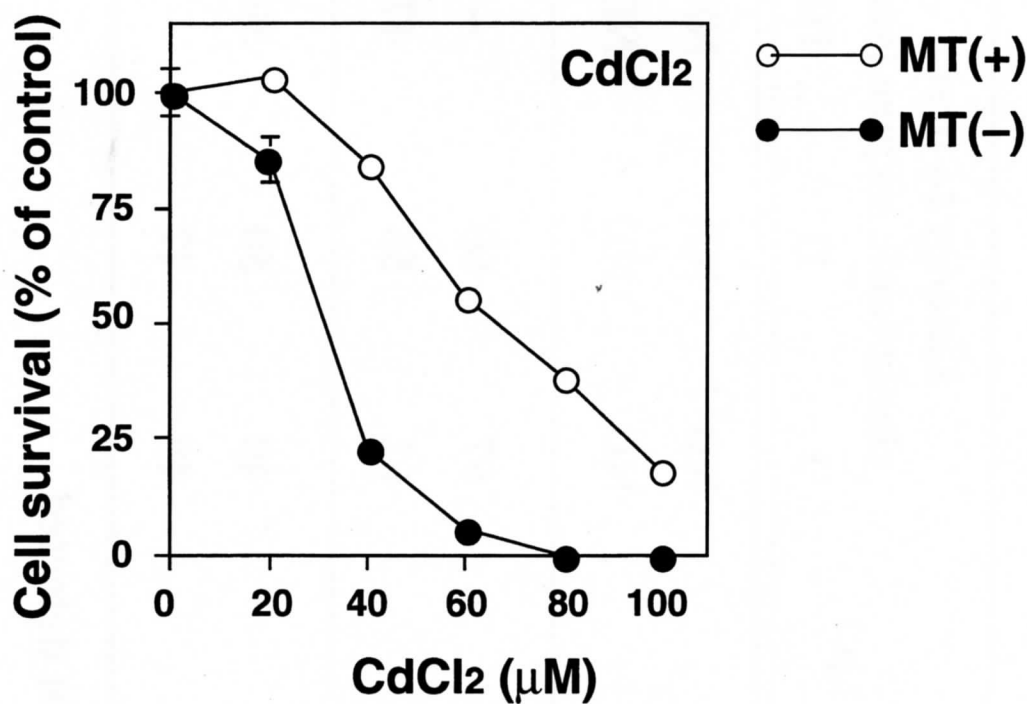
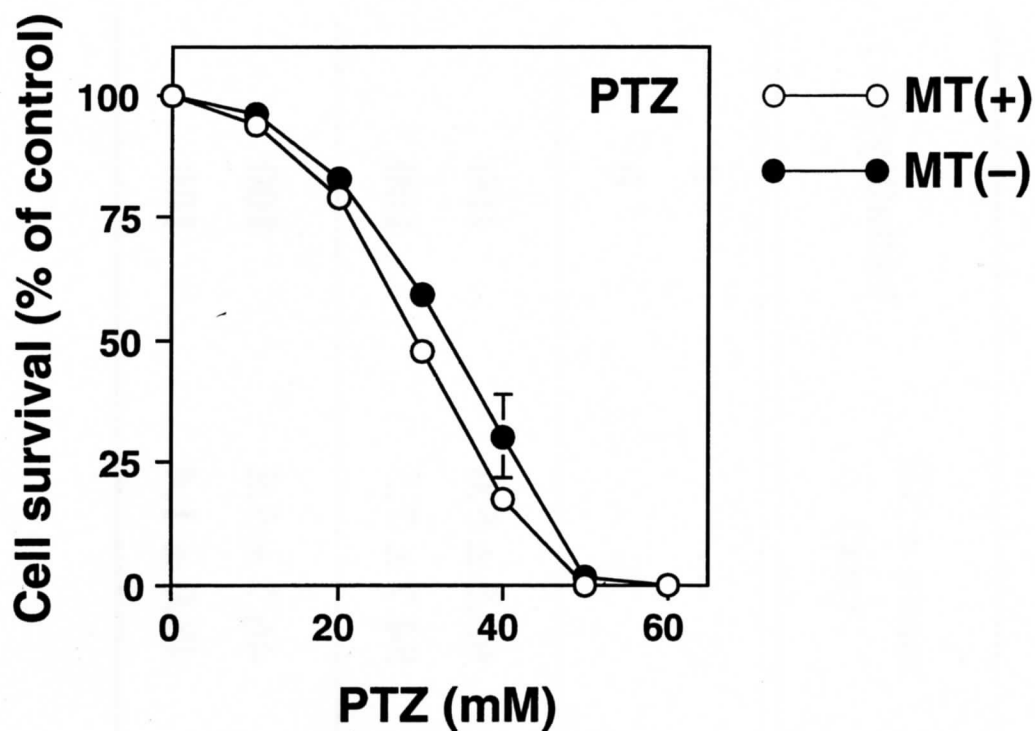
**Fig. 16**  
**Effect of ZnCl<sub>2</sub> on NM31 and MT mRNA Levels in MT(+) and MT(-) Cells**



**Fig. 17**

**Effect of Pentylenetetrazole (PTZ) on NM31 mRNA Level in MT(+) Cells after 30 min or 60 min Treatment**



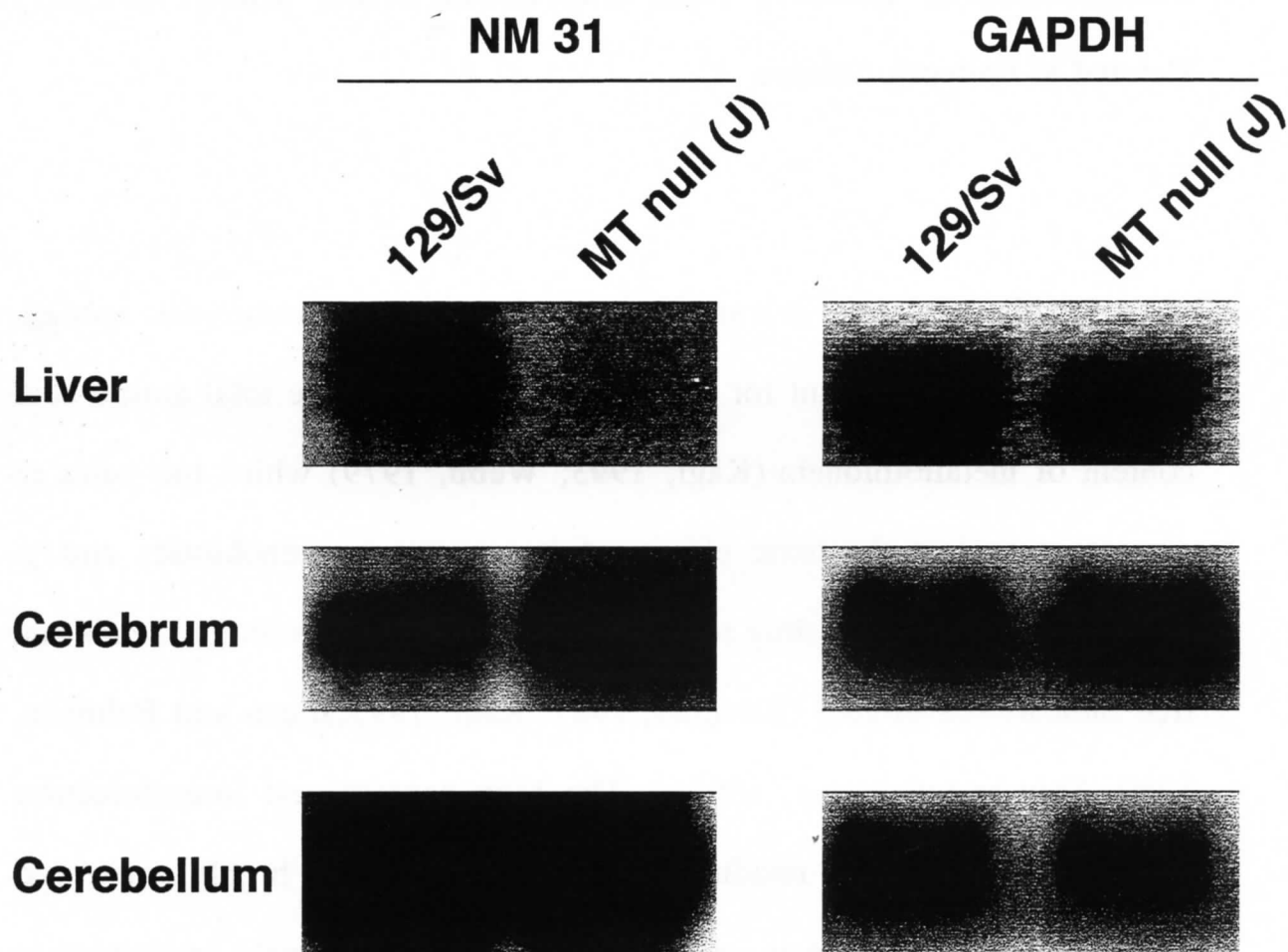


**Fig. 18**  
**Sensitivities of MT(+) and MT(-) Cells to**  
**Pentylentetrazole (PTZ) and CdCl<sub>2</sub>**

mouse	PTZ (mg/kg, i.p.)	Latency to first clonic/tonic seizure (sec)			mean $\pm$ SD (sec)	lethality (%)
		I	II	III		
129/Sv	30	ND <sup>*)</sup>	ND	ND	–	0
MT-null		ND	ND	ND	–	0
129/Sv	75	67	60	–	63.5 $\pm$ 5.0	100
MT-null		62	55	47	54.7 $\pm$ 7.5	100
129/Sv	100	40	50	50	46.7 $\pm$ 5.8	100
MT-null		49	47	–	48.0 $\pm$ 1.4	100

\*) ND : Seizures were not detected.

**Table 1**  
**Pentylentetrazole (PTZ) - induced Seizures in 129/Sv and MT-null Mice**



**Fig. 19**  
**Expression of NM31 specific RNA in Various**  
**Tissues of 129/Sv and MT-null Mice**

## **Metallothionein Mediates Gene Expression of 3.1 mRNA (PTZ17) Related to Epileptic Seizure**

Metallothionein(s) is a small protein found in most eukaryotic species. Cysteine residues account for approximately 30 % of the total amino acid content of metallothionein (Kägi, 1993; Webb, 1979) which has roles in protection against the toxic effects of heavy metals, xenobiotics and  $\gamma$ -irradiation, as well as in drug resistance, homeostasis of essential metals and free radicals scavenging (Bremner, 1987; Kägi, 1993; Lazo and Bahnson, 1989; Sato and Bremner, 1993). The high content and intermolecular localization of cysteine residues in metallothionein are highly conserved among species; these facts are considered to be extremely important to metallothionein function (Hamer, 1986; Kägi, 1993). On the other hand, nuclear localization of metallothionein in mammalian cells has been reported by several investigators (Cherian, 1994; Kuo *et al.*, 1994; Panemangalore *et al.*, 1983), indicating that metallothionein may also be associated with nuclear functions. We speculated that metallothionein is involved in gene expression. We therefore screened the genes that are expressed when the metallothionein

gene is disrupted

## MATERIALS AND METHODS

*Differential display screening.* Total RNA was extracted from exponentially growing cells or from mouse liver using guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (Chomczynski and Sacchi, 1987). Differential display proceeded as described by Liang and Pardee (Liang *et al.*, 1994). Total RNA (0.1 µg) was converted to single stranded cDNA using MMLV-reverse transcriptase and primers anchored by one base in a volume of 20 µl. The solution (1 µl) containing cDNA was then added to a PCR reaction mixture (10 µl) containing 2 µM of the anchored and random primers, 2 µM dNTP, 0.5 µCi of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP and 0.5 units of Taq polymerase (Boehringer). PCR proceeded using a thermal cycler (MP; Takara) through 40 cycles of 94 °C for 30 sec, 40 °C for 2 min and 72 °C for 30 sec followed by 72 °C for 5 min. The amplified cDNAs (3.5 µl) were separated on a 6% sequencing gel, blotted on 3M paper, dried and exposed to X-ray film. Bands of interest were eluted from the gel by boiling in water. DNA was precipitated in ethanol, then re-amplified using the same primer set and PCR conditions except the dNTP concentrations were 20 µM and no isotope was added. PCR samples were separated on a 1.5% agarose gel, extracted and used as a probe for Northern hybridization.

*Northern blot analysis.* Total RNA (20 µg) was resolved by electrophoresis on 0.8% agarose/formaldehyde gels, then transferred to Hybond-N+nylon membrane (Amersham), and UV cross-linked. The membrane was then hybridized overnight with random primed [<sup>32</sup>P]dCTP-labelled cDNA fragments obtained as above. The membrane was washed and exposed to X-ray film overnight at -80 °C with an intensifying screen. The membrane was stripped and re-probed with <sup>32</sup>P-labelled GAPDH cDNA as an internal control.

*Gene transfer.* MT(-)cells were incubated with a calcium phosphate precipitate containing 12 µg of DNA (10 µg of pKH plasmid containing the MT-I and -II genes(Searle *et al.*, 1984) and 2 µg of pcDEBD containing hygromycin-B phosphotransferase as a selective marker) for 7 hr. This mixture was replaced with normal medium and incubated for a further 48 hr. Stably transfected cells were selected by culture in the presence of hygromycin-B (300 µg/ml, Boehringer) for about 14 days. Clones resistant to hygromycin-B were selected and expanded.

## RESULTS AND DISCUSSION

We isolated and established SV40-immortalized stellate cell lines from the livers of transgenic mice deficient in the genes for metallothionein-I and -II (Masters *et al.*, 1994) and from normal 129/Sv mice (controls). These cells were designated as IMS-MT (-) (immortalized mouse stellate cells from MT-null mouse) and IMS-N (immortalized mouse stellate cells from normal mouse), respectively. We examined total RNA sample from both cell lines by differential display (Liang *et al.*, 1994), and we found one cDNA (tentatively named NM31) that was expressed only in IMS-N cells (Fig. 1a). Northern hybridization using NM31 as a probe confirmed that this gene was expressed at negligible levels in IMS-MT (-) cells (Fig. 1b). These results suggested that metallothionein(s) is involved in NM31 gene expression. To confirm this notion, plasmid pKH containing mouse metallothionein-I and -II genes (Searle *et al.*, 1984) (a kind gift from Dr. R. D. Palmiter) was introduced into IMS-MT (-) cells. Stable transformants called IMS-MT (-)/pKH, expressed both normal and disrupted mutant metallothionein I and II mRNA as shown in Fig. 2a. Synthesis of metallothionein protein was induced by zinc chloride in IMS-N and IMS-MT (-)/pKH, but not in IMS-MT (-) cells. Moreover, IMS-MT (-)/pKH cells were significantly less sensitive than IMS-MT (-) cells to cadmium, indicating that IMS-MT (-)/pKH cells produce functional metallothionein proteins. We then compared the level of NM31 gene

expression in IMS-MT (-) and IMS-MT (-)/pKH cells by Northern hybridization. NM31 was expressed at high levels in IMS-MT (-)/pKH cells (Fig. 2b). This finding suggests that NM31 gene expression is essentially mediated by metallothionein. It is believed that most of the biological functions of metallothionein are due to an abundance of cysteine residues. The present study presents a new concept to explain the biological roles of metallothionein: it may mediate the expression of specific genes.

The nucleotide sequence of NM31 (294 bp) was identical to the 3' region of 3.1 mRNA (Studler *et al.*, 1993), which is abundant in the embryonic mouse brain. The gene for 3.1 mRNA is conserved at least in the mouse and in humans, where it is mainly expressed in the cerebellum, hippocampus and olfactory bulb (Studler *et al.*, 1993). On the other hand, Kajiwara *et al.* (Kajiwara *et al.*, 1995) also isolated the gene for this 3.1 mRNA (PTZ17) as the gene related to chemically induced seizures. The expression of 3.1 mRNA in the mouse brain is significantly depressed by an intraperitoneal administration of pentylenetetrazole, which induces seizures (Kajiwara *et al.*, 1995). During the bursting activity induced by pentylenetetrazole, intracellular calcium is released from storage sites and moved to the inner surface of the cell membrane in neurons (Sugaya and Onozuka, 1978a; Sugaya and Onozuka, 1978b). The injection of 3.1 mRNA into *Xenopus* oocytes potentiates the pentylenetetrazole-induced calcium inward current and an



intracellular calcium increase (Kajiwara *et al.*, 1995). We examined 3.1 mRNA expression in the brain and other tissues of normal and of transgenic mice deficient in the genes for metallothionein I and -II, by Northern hybridization using a 3.1 mRNA cDNA as a probe. Figure 3 shows that the transcript was essentially undetectable in the livers and kidneys of mice deficient in metallothionein-I and -II. However, substantial levels of 3.1 mRNA were expressed in the mouse cerebellum, although these mice were metallothionein-I and -II deficient (Fig. 3). A brain-specific isoform (MT-III) of metallothionein has been isolated and observed to inhibit survival of cultured rat neurons and to be deficient in the brains of patients with Alzheimer's disease (Palmiter *et al.*, 1992; Uchida *et al.*, 1991). The metallothionein-null mice used in this study express the gene for metallothionein-III. Erickson *et al.* (Erickson *et al.*, 1997) reported that mice deficient in metallothionein-III are more susceptible to seizures induced by kainic acid. Therefore, metallothionein-III might play a role in the expression of 3.1 mRNA in the brain. Epileptic seizures affect about 0.5% of the population (Kajiwara *et al.*, 1995), but the mechanism of their manifestation remains unclear. However, we conclude that metallothionein(s) is involved in chemically induced seizures by mediating 3.1 mRNA gene expression.

## REFERENCES

Bremner, I. (1987) Nutritional and physiological significance of metallothionein. In Kagi, J.H.R. and Kojima, Y. (eds.), *Metallothionein II, Experientia Suppl.*

Birkhauser Verlag, Basel, Vol. 52, pp. 81-107.

Cherian, M.G. (1994) The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells. *Environ. Health Perspect.*, **102**, 131-135.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159.

Erickson, J.C., Hollopeter, G., Thomas, S.A., Froelick, G.J. and Palmiter, R.D. (1997) Disruption of the metallothionein-III gene in mice: analysis of brain zinc, behavior, and neuron vulnerability to metals, aging, and seizures. *J. Neurosci.*, **17**, 1271-1281.

Hamer, D.H. (1986) Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 913-951.

Kajiwara, K., Sugaya, E., Kimura, M., Katsuki, M., Nagasawa, H., Yuyama, N., Tsuda, T., Sugaya, A., Motoki, M., Ookura, T. and et al. (1995) Cloning and characterization of pentylenetetrazol-related cDNA, PTZ-17. *Brain Res.*, **671**, 170-174.

Kuo, S.M., Kondo, Y., DeFilippo, J.M., Ernstoff, M.S., Bahnson, R.R. and Lazo, J.S. (1994) Subcellular localization of metallothionein IIA in human bladder tumor cells using a novel epitope-specific antiserum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **125**, 104-110.

Kägi, J.H.R. (1993) Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In Suzuki, K.T., Imura, N. and Kimura, M. (eds.), *Metallothionein III*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 29-55.

Lazo, J.S. and Bahnson, R.R. (1989) Pharmacological modulators of DNA-interactive antitumor drugs. *TiPS*, **10**, 369-373.

Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R.P., Averboukh, L., Wang, F. and Pardee, A.B. (1994) Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Research*, **22**, 5763-5764.

Masters, B.A., Kelly, E.J., Quaife, C.J., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D.

(1994) Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 584-588.

Palmiter, R.D., Findley, S.D., Whitmore, T.E. and Durnam, D.M. (1992) MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 6333-6337.

Panemangalore, M., Banerjee, D., Onosaka, S. and Cherian, M.G. (1983) Changes in the intracellular accumulation and distribution of metallothionein in rat liver and kidney during postnatal development. *Developmental Biology*, **97**, 95-102.

Sato, M. and Bremner, I. (1993) Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biol. Med.*, **14**, 325-337.

Searle, P.F., Davison, B.L., Stuart, G.W., Wilkie, T.M., Norstedt, G. and Palmiter, R.D. (1984) Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes. *Molecular & Cellular Biology*, **4**, 1221-1230.

Studler, J.M., Glowinski, J. and Levi-Strauss, M. (1993) An abundant mRNA

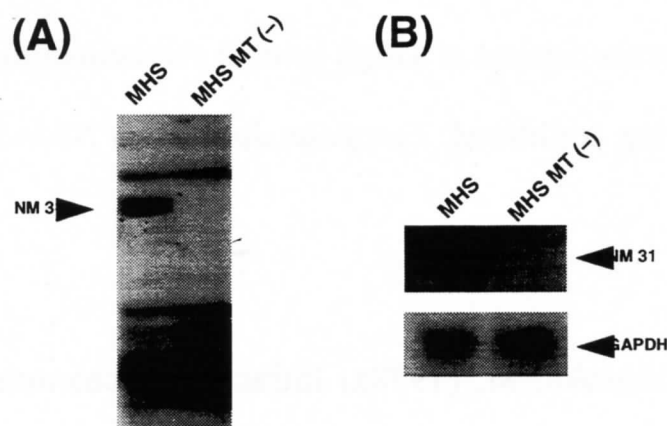
of the embryonic brain persists at a high level in cerebellum, hippocampus and olfactory bulb during adulthood. *European Journal of Neuroscience*, **5**, 614-623.

Sugaya, E. and Onozuka, M. (1978a) Intracellular calcium: its movement during pentylenetetrazole-induced bursting activity. *Science*, **200**, 797-799.

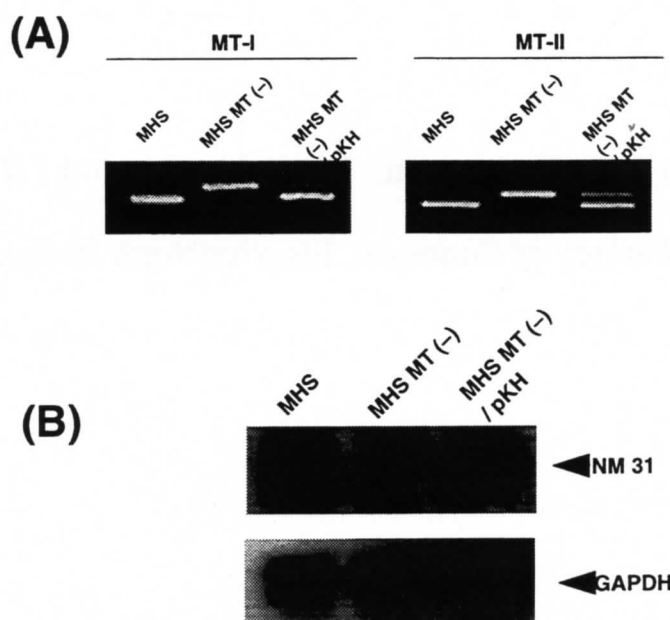
Sugaya, E. and Onozuka, M. (1978b) Ion shower milling: its application to cell membrane removal. *Science*, **202**, 1197-1198.

Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. and Tomonaga, M. (1991) *Neuron*, **7**, 337-347.

Webb, M. (1979) Metallothionein. In Webb, M. (ed.) *The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium*. Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 195-266.



**FIG. 1 a**, Gene expression in IMS-N and IMS-MT (-) cells. Total RNA extracted from both cell lines was the template for reverse transcription and subsequent PCR amplification in the presence of [32P]-dCTP. The amplified products were resolved on 6% DNA sequencing gels and visualized by autoradiography. The NM31 arrow indicates an mRNA species amplified in IMS-N, but not in IMS-MT (-) cells. **b**, Northern hybridization of NM31 mRNA in IMS-N and IMS-MT (-) cells. NM31 cDNA (excised from the gel shown in a) was re-amplified and labelled with 32P-dCTP. GAPDH mRNA was determined as a loading control.



**FIG. 2** Effect of introduction of plasmid pKH, carrying the genes for metallothionein-I and II, into IMS-MT (-) cells on expression of metallothionein-I (MT-I) and -II (MT-II) and NM31 mRNA. RNAs from IMS-N, IMS-MT (-) and the transformed cell line (IMS-MT (-)/pKH) were analyzed by RT-PCR using primers specific for metallothionein-I and -II, respectively (Masters *et al.*, 1994) (a), or by Northern blotting analysis using NM31 cDNA as a probe (b).

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。